

THESIS MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchungen über die Verteilung
der Gc-Typen bei Patienten mit serologisch
positiver chronischer Polyarthrit

von

IRMGARD HINDELANG

München 1966

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen über die Verteilung der Gc-Typen bei Patienten mit
serologisch positiver chronischer Polyarthrititis

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Irmgard Hindelang
aus
Ebersberg
1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent : Privatdozent Dr. H. Mathies

Korreferent : Professor Dr. W. Seitz

Dekan : Professor Dr. Rudolf Zenker

Tag der mündlichen Prüfung : 19. April 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
P r o b l e m a t i k	1 - 25
Erbfaktoren bei chronischer Polyarthrititis	1 - 10
Blutgruppen und chronische Polyarthrititis	10 - 15
Go - Gruppen	15 - 25
P r i n z i p i e n u n d T e c h n i k e n immunoserologischer Untersuchungen	25 - 35
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	35 - 45
Versuchsreihe 1	35 - 39
Blutgruppenbestimmung mit Eldontestkarten	
Material und Reagentien	35
Methodik	36
Krankengut	37
Ergebnisse	38
Versuchsreihe 2	39 - 45
Go - Typenbestimmung nach Hirschfeld	
Material und Reagentien	39
Methodik	39
Krankengut	44
Ergebnisse	45
D i s k u s s i o n	46 - 49
Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	51 - 58



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154016_0060

P r o b l e m a t i k

Erbfaktoren bei chronischer Polyarthrit

Trotz vieler Forschungen und Theorien ist die Ätiologie der ohronischen Polyarthrit (c.P.)noch in vielem ungeklärt.Vor allem wurden in neuerer Zeit verschiedene prädisponierende,erbliche Faktoren diskutiert (B e h r e n d , 10). Diese Annahme legte natürlich die Frage nahe,ob solche Faktoren in irgendeinem Zusammenhang mit anderen erblichen Merkmalen stehen können.Daraus ergibt sich auch die Forderung,dass alle erblichen Faktoren,die neu entdeckt werden,bei chronischer Polyarthrit untersucht werden,um einen etwaigen prädisponierenden Faktor genauer definieren zu können.

Von den bisher bei c.P. untersuchten erblichen Komponenten sind an erster Stelle die Blutgruppen,die Haptoglobin- und die Gm- Gruppen zu nennen.Bei den Haptoglobingruppen handelt es sich um ein polymorphes Serumglobulin der α_2 - Globulinfraktion.Die Gm - Gruppen gehören der γ - Globulinfraktion an und sind ebenfalls ein polymorphes System.1959 wurde von H i r s c h f e l d (46) das polymorphe Gc - System entdeckt,bei dem es sich um erbliche Serumproteine handelt.

Mir wurde nun die Aufgabe gestellt,diese Gc - Gruppen bei c.P. zu untersuchen.Bei dieser Untersuchung wurde gleichzeitig die Bestimmung der klassischen Blutgruppen mitgeführt.

Schon im 19.Jahrhundert wurden Erbfaktoren bei den rheumatischen Erkrankungen diskutiert.Die ersten Familienuntersuchungen aus dieser Zeit liegen von englischen Autoren vor.(F u l l e r , S y e r s , P s e S m i t h und C h e a d l e - zit.

P r i b r a m 74).Aus ihren Untersuchungen geht eindeutig eine hereditäre Veranlagung für ohronische Polyarthrit hervor.

Zu erwähnen sind ausserdem F o x und v a n B r e e m e n 1934 (zit. de B l é c o u r t 16),die von einem "roten Faden " sprachen,der sich durch Rheumatiker-Familien ziehe.

1939 veröffentlichte H a n g a r t e r (36) eine Literaturübersicht über dieses Gebiet. Er nahm an, dass verschiedene rheumatische Erkrankungen nebeneinander in bestimmten Familien vorkommen. 1938 berichteten H o l s t i und H u u s k o n e n (zit. de B l é c o u r t 16) über eine Befragung von 195 000 Finnen. 0,9 % litten an einer rheumatischen Erkrankung, und verschiedene Formen des Rheumatismus erschienen in derselben Familie. Diesen Veröffentlichungen vor dem 2. Weltkrieg über die Erbllichkeit des Rheumatismus liegt jedoch meist keine exakte Trennung zwischen den einzelnen Rheumatismus-Formen zugrunde.

Von den gegenwärtigen Forschern wären als erste S t e c h e r und Mitarbeiter (zit. de B l é c o u r t 16) zu nennen. Stecher nahm an, dass jede Form des Gelenkrheumatismus einen spezifischen Erbmechanismus aufweist. Ausserdem wurde angenommen, dass ein möglicher Erbfaktor nicht per se die Manifestation einer rheumatischen Erkrankung bestimmt, sondern dass auch endogene und exogene Faktoren das klinische Bild der rheumatischen Erkrankungen beeinflussen. Weitere Untersuchungen über c.P. wurden vorgenommen, wobei folgende Ergebnisse erhalten wurden (entnommen aus P r i b r a m 74): G a r r o d fand nur in 13 % von 500 Fällen mit c.P. diese Krankheit auch in der Familie. B a n n a t y n e entsprechend 5 % unter 293 Fällen. H u t c h i n s o n dagegen fand, dass in nicht weniger als 44 unter 90 in dieser Hinsicht untersuchten Fällen auch andere Familienmitglieder dieselbe Krankheit hatten.

K r o n e r stellte entsprechendes Ergebnis bei 21 unter 50 Fällen fest. Die Untersuchungen von D a w s o n ergaben, dass bei 14 von 100 untersuchten Fällen mit chronischer Polyarthrititis eine gleiche Erkrankung unter Eltern oder Geschwistern vorkam. Von 1954 bis 1958 wurde die umfangreichste Untersuchung, die bisher im Schrifttum dargelegt wurde, von de B l é c o u r t (15) durchgeführt. Sie umfasste ungefähr 8 000 nächste Blutsverwandte von 300 Ausgangspersonen (Niederländer). De Blécourt fand in 34 % eine familiäre Häufung der c.P. und schloss daraus auf eine erbliche Komponente. E d s t r ö m (25) stellte in seinen Familienuntersu-

chungen bei 262 Fällen von o.P. fest, dass in 51 % der Fälle wenigstens ein weiterer gleicher Fall in der nächsten Verwandtschaft vorlag, in 19 % wenigstens zwei weitere, in 3 % wenigstens drei weitere Fälle. Stammtafeln in dieser Hinsicht wurden aufgestellt von Edström, Zellner, Wiesel, Weitz, Hangarter, Boquien, Ravault und anderen (zit. Edström 25)

Auch wurden von verschiedenen Autoren Zwillingsforschungen durchgeführt, um die Erbllichkeit der o.P. genauer zu untersuchen. Edström (25) untersuchte 5 Paare eineiiger Zwillinge mit chronischem Gelenkrheumatismus. Dabei erwiesen sich 3 Paare als konkordant mit völlig übereinstimmenden Krankheitsbildern, während 2 Paare diskordant waren. Von 9 zweieiigen Zwillingen waren 8 Paare diskordant, während im 9. Fall beide an o.P. litten (zit. Edström 25). Bei 10 weiteren Paaren monozygoter Zwillinge waren nur 3 diskordant (Kellgren 53). Moesmann (zit. Schade 76) stellte ausserdem bei 50 eineiigen Zwillingspaaren eine Konkordanz von 36 % fest. Nach einer Zusammenstellung von Teodori, Neri Serneri und Thyman (zit. Schade 76) wurde bei 55 eineiigen Zwillingspaaren eine Konkordanz von 21,8 %, bei 43 zweieiigen Zwillingspaaren dagegen nur eine Konkordanz von 11,6 % gefunden. Diese Zwillingsforschungen sprechen gegen die Annahme, dass die erhöhte Erkrankungs-wahrscheinlichkeit bei Verwandten von o.P.-Kranken allein auf Umwelteinflüssen beruhen könnte. So fand auch de Blécourt (15) bei seinen Bevölkerungsuntersuchungen keinen Zusammenhang zwischen dem Feuchtigkeitsgrad der Wohnungen und dem Vorkommen irgendeiner Form von Rheumatismus. Ebenso kommen Untersuchungen über die besonderen Verhältnisse der Wohngemeinschaften in israelischen Kibbutzen zu denselben Ergebnissen, allerdings nicht bezüglich der Erbllichkeit speziell der chronischen Polyarthrititis. In diesen Wohngemeinschaften herrscht eine relativ gleichmässige Verteilung des Streptokokken-Befalls der Bewohner, aber nur die

erblich belasteten Familien zeigen eine Häufung von akutem sowie chronischem Gelenkrheumatismus (K ö t t g e n 56). Ähnliches erbrachten die Untersuchungen von W e i t z (95), P r i b r a m (74) und L a w r e n c e (60).

Auf Grund dieser Untersuchungen wurden verschiedene Theorien über eine erbliche Komponente bei c.P. aufgestellt. De B l é c o u r t (15) nimmt an, dass die erbliche Komponente, die durch Familienuntersuchungen usw. nachgewiesen werden konnte, einen dominanten Erbgang hat, da er in seinen Untersuchungen die meisten Sekundärfälle bei Familienangehörigen ersten Grades vorfand.

Ausserdem erscheint ihm der eventuelle Einfluss von Konsanguinität und damit die Möglichkeit eines rezessiven Erbganges als unwahrscheinlich. Ebenso schlug S t e c h e r 1957 (zit. 53) einen dominanten Erbgang vor. Bei Annahme eines solchen Erbganges findet K e l l g r e n (53) eine Prädispositionshäufigkeit von ungefähr 1,3 %. Diese Auffassung bestätigen auch die Untersuchungen von E d s t r ö m (25), C l a u s s e n (zit. 36) und H a n g a r t e r (36).

Nach Untersuchungen in Bezug auf die Geschlechtsverteilung tritt die c.P. häufiger bei weiblichen Patienten auf. Von den Sekundärfällen bei c.P. entfielen 3,48 % auf Frauen und nur 1,25 % auf Männer (de B l é c o u r t 15). Diese Sekundärfälle wurden absteigend sowohl mütterlicherseits als auch väterlicherseits gefunden. De B l é c o u r t (15, 16) hält deshalb gonosomale Faktoren für unwahrscheinlich. K e l l g r e n (53) nimmt an, dass die Häufung von c.P. bei Frauen damit zu erklären sei, dass Frauen eine schwächere Konstitution und einen schnelleren Abbau des Stützgewebes aufweisen.

Da krankhafte erbliche Zustände fast immer auf einzelnen Erbanlagen (monomer) beruhen, normale Eigenschaften aber durch viele Erbanlagen (polymer) bedingt sind, nimmt H a n g a r t e r (36) für die Vererbung der c.P. einen monomeren Erbgang an. De B l é c o u r t (15) hält dagegen einen einfachen Erbgang für sehr unwahrscheinlich.

Von den meisten Autoren wird also für die chronische Polyarthrititis ein Erbgang angenommen, der dominant und nicht geschlechtsgebunden ist, aber Unterschiede an Penetranz zwischen Männern und Frauen aufweist.

Ebenso wurden verschiedene Theorien über die Manifestation der o.P. aufgestellt. P r i b r a m (74) glaubt, dass es sich beim Rheumatismus nicht um eine direkte hereditäre Übertragung handelt, sondern nur um eine solche Disposition, welche beim Eintreten geeigneter äusserer z.B. infektiöser Momente die Erkrankung determiniert. H a n g a r t e r (36) stellte die Haupt- und Neben-Gen-Theorie für eine allgemein polyarthritische Erbanlage auf. Neben Umweltfaktoren können noch erbliche Faktoren den Ausdruck oder den Durchschlag der polyarthritischen Krankheitsanlage fördernd oder hemmend beeinflussen. Dieser verändernde, erbliche Faktor, das "Neben-Gen" ist nach Hangarter für die Polyarthrititis die allergische Diathese. Dieses Neben-Gen wirkt auf das spezifische polyarthritische Haupt-Gen ein (genotypische Gesellschaft). Hangarter ist ferner der Auffassung, dass es eine spezifische polyarthritische Erbanlage gibt, die sich unregelmässig, d.h. mit wechselnder Penetranz vererbt. Unter wechselnder Penetranz versteht er das Überspringen einer Generation, verursacht durch Umwelteinflüsse oder durch Neben-Gene. Das Haupt-Gen entscheidet über die Entwicklung der Polyarthrititis, während das Neben-Gen die akuten und die chronischen Gelenkerkrankungen verändert oder in andere Richtungen lenkt.

K e l l g r e n (53) nimmt eine zweifache Ätiologie an. Die Gene steuern die Enzym- oder Protein-Synthese und wirken so auf die Entwicklung ein. Bei den rheumatischen Erkrankungen konnten solche biochemischen Defekte nicht gefunden werden. Kellgrens Hypothese geht nun dahin, dass ein Teil der Bevölkerung genetisch prädisponiert ist, und zwar für bestimmte immunologische Abweichungen, von denen gegenwärtig nur indirekte Anzeichen bekannt sind. Von Umweltfaktoren kann es abhängen, wie auch von wiederholten

Infektionen usw., ob diese immunologischen Abweichungen zur Auswirkung kommen oder nicht. Die Entwicklung und die klinisch manifeste Erkrankung und ihre Lokalisation an den Gelenken kann nach K e l l g r e n (53) durch alles, was die Entstehung von Gewebskrankheiten beeinflusst, gesteuert werden.

Z i f f (103, 104) glaubt, dass bei der chronischen Polyarthrits eine genetisch bedingte Abnormität der antikörperbildenden Zellen mit Verlust der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen vorliegt.

Eine wichtige Rolle spielt auch der Rheuma-Faktor. Der Rheuma-faktor, ein γ_{1M} - Globulin, wird vorwiegend bei Patienten mit o.P. gefunden. Dieses Globulin unterscheidet sich von den γ_{1M} - Globulinen des Gesunden dadurch, dass es ein mit serologischen Methoden nachweisbares Bindungsvermögen für γ_2 - Globulin - Moleküle besitzt (W u h r m a n n und M ä r k i 101). Rh - positive Erythrozyten, die mit inkompletten Rh - Antikörpern beladen sind, können von einem Rheuma-Serum, das diesen Rheuma-Faktor enthält, agglutiniert werden (G r u b b 34). Folgendes ist aus W u h r m a n n und M ä r k i (101) entnommen: Die oben genannte Agglutination kann durch Seren oder γ - Globulin bestimmter Menschen gehemmt werden und zwar, wenn die Seren, die γ -Globulin - Gruppe Gm (a+) enthalten. Der hemmende Faktor ist wahrscheinlich in der γ_2 - Komponente des γ - Globulin - Systems zu suchen, da er durch SH-Verbindungen nicht inaktiviert werden kann. Gehören die Seren zur Gruppe Gm (a-), fehlt also der Faktor Gm(a+), so kann der Rheuma-Faktor mit den inkompletten Antikörpern reagieren und die Erythrozyten agglutinieren, wie in folgendem Schema ersichtlich wird:

Rh-pos. Ery. + inkomplette Anti-Rh + Gm(a+) + Rheuma-Faktor =
Inhibition

Rh-pos. Ery. + inkomplette Anti-Rh + Gm(a-) + Rheuma-Faktor =
Agglutination

Die erbliche Komponente, die für die rheumatischen Erkrankungen

angenommen wurde, gilt auch für den Rheuma-Faktor. Belastete Eltern haben nicht nur häufiger Kinder, die an chronischer oder akuter Polyarthrititis erkranken, sondern unter ihren Nachkommen sind zusätzlich klinisch Gesunde mit positivem Latex-Hemmtest (10). De B l é - c o u r t (16) hält es für sehr wahrscheinlich, dass bei der Entstehung von rheumatischer Arthritis nicht nur "Erblichkeit des Rheuma-Faktors", sondern noch andere Erbfaktoren eine Rolle spielen. Das Vorkommen des Rheuma-Faktors zeigt familiäre Häufung (L a w r e n c e und B a l l 60; Z i f f , S c h m i d , L e w i s und T a n n e r zit. 53). Der Rheuma-Faktor scheint für rheumatische Erkrankungen prädisponierend zu sein. Er wird allgemein als ein Antikörper eines abnormen oder veränderten γ S-Globulins angenommen und scheint nicht direkt die Pathogenese der Arthritis zu betreffen.

Im folgenden werden die wichtigsten Serum-Proteine aufgeführt (W u h r m a n n und M ä r k i 101). Nach einem vererbten Strukturmuster werden die Serum-Proteine intrazellulär aufgebaut. Der Desoxyribonukleinsäure (DNS) - Anteil der Chromosomen nimmt nicht an der Protein-Synthese teil, er enthält lediglich die entsprechenden Informationen für die Protein-Bio-Synthese. Wie diese Informationen auf die unlöslichen Ribonukleinsäuren (RNS) des Plasmas übertragen werden, ist bis jetzt noch nicht bekannt. Wahrscheinlich enthält die RNS des Plasmas die Matrizen, welche die Protein-Struktur durch Anbau von Aminosäuren an entsprechender Stelle bestimmen. Mit Hilfe des Ergastoplasmas werden die Serum-Proteine aus den Zellen in den Kreislauf geschafft. Wieviel definierte Proteine im menschlichen Serum vorhanden sind, ist noch nicht bekannt. Die wichtigsten sind in Tabelle 1 zusammengestellt:

Tabelle 1

Serum - Protein	Molekular-Gewicht (M G)
Fibrinogen	400 000 - 580 000
Lipoproteine	200 000 - 5 900 000
Präalbumin	61 000
Serum - Albumin	69 000
α_1 -Seromucoid	44 100
α_2 -Coeruloplasmin	151 000
α_2 -Makroglobulin	820 000
α_2 -Glykoproteine mit niedrigem MG	
α_2 -Haptoglobin	85 000
β_1 -Transferrin	88 000
γ -Globulin-System	156 000

Einteilung :

γ_{1A} -Globuline	ca 150-170 000
γ_{1M} -Globuline	ca 1 000 000
γ_2 -Globuline	150-170 000

Zu nennen sind noch: Postalbumine, Ag-Gruppen, Gc-Gruppen und Serumenzyme.

Gewisse Plasma-Proteine können von Individuum zu Individuum Unterschiede aufweisen, die ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften betreffen. Und zwar können sie in zwei oder mehreren Varianten vorkommen. Dabei handelt es sich um erblich bedingte Sonderheiten (sogenannte Plasmaprotein-Gruppen).

Plasma-Protein-Gruppen und erbliche Defektdysproteinämien
(W u h r m a n n u n d M ä r k i 101) sind in Tabelle 2
zusammengestellt.

Tabelle 2

	Plasmaprotein-Gruppe	Defektdysproteinämie
Albumine	Doppelalbuminämie(100) Paralbumin Albumin-Gruppen(73) Postalbumin-Gruppen: 2 Muster	Analbuminämie
α_1 - Globulin	-	-
α_2 - Globuline		Acoceruloglasminämie
	Hp-Gruppen: Hp 1-1 Hp 2-1 Hp 2-2 Hp 2-1 mod	Ahaptoglobinämie Hp 0-0
	Ag-Gruppen: Ag (a+) Ag (a-)	
	Gc-Gruppen: Gc 1-1 Gc 2-1 Gc 2-2	
β - Globuline		Abetalipoproteinämie
	Transferringruppen: Komponenten (88) $B_0, B_1, B_2, C,$ D_0, D_1, D_2, D_3	Atransferrinämie
γ - Globuline		Agammaglobulinämie
	Gm-Gruppen (35): Gm (a+) Gm (a-) Gm (x+) Gm (x-) Gm (b+) Gm (b-)	
Fibrinogen		Afibrinogenämie

Im folgenden wird untersucht, ob die klassischen Blutgruppen als
älteste, bekannte, erbliche Faktoren eine Parallele oder Abhängig-
keit zu Seren von c.P.-Patienten aufweisen.

Blutgruppen und chronische Polyarthrit

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde von zahlreichen Forschern, vor allem von Shattock, Ascoli, Eisenberg sowie Donath (zit. 75) darüber berichtet, dass sich Blutproben verschiedener Menschen gegenseitig verklumpen können. Aus allen Arbeiten war jedoch mehr oder weniger zu entnehmen, dass dieses Phänomen mit irgendeiner Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurde (75). 1901 stellte Landsteiner (zit. 90) erstmals das Vorhandensein verschiedener Blutgruppen beim gesunden Menschen fest. Nach seiner ursprünglichen Theorie werden die Blutgruppen durch die beiden Agglutinogene A und B der Erythrozyten, sowie durch die zwei natürlichen Isoagglutinine Anti-A (α) und Anti B (β) des Serums bestimmt (98). Es ergibt sich somit für die 4 Blutgruppen folgende vollständige Formel:

O	$\alpha\beta$
A	β
B	α
AB	o

Demnach sind in einem Blut nur die verträglichen Agglutinine vorhanden, und zwar regelmässig, während die unverträglichen Agglutinine regelmässig fehlen (Landsteiner'sche Regel).

In der folgenden Zeit wurden ausser den ABO - Substanzen noch weitere gruppenspezifische Substanzen gefunden. Als wichtigste davon sind die von Landsteiner und Levine 1930 entdeckten MN - und Pp - Substanzen zu nennen (zit. 22). 1940 wurden ausserdem von Landsteiner und Wiener die Rh - Substanzen entdeckt (zit. 75).

Chemie der Blutgruppen:

Chemische Untersuchungen zeigten, dass die ABO - Blutgruppensubstanzen im Körper in zwei Formen vorkommen. Die eine Form findet sich auf den Erythrozyten und allen übrigen Körperzellen und ist in organischen Lösungsmitteln löslich. Der Erythrozyt besitzt nämlich eine Lipoproteinhülle, die sich auf Grund ihres serologischen Verhaltens aus einer regelmässig gemusterten mosaikartigen

Struktur zusammenzusetzen scheint. Diese Struktur soll durch die regelmässige Anordnung von Agglutinogenen bedingt sein (98). Die andere Form der ABO - Blutgruppen hingegen besteht aus wasserlöslichen Mucopolysacchariden. Bei der weissen Rasse ist diese Form bei ungefähr 75 % aller Individuen anzutreffen (98). In den sekretorischen Organen kommt diese Form in grösster Konzentration vor, z.B. in den Speicheldrüsen, dem Pankreas, der Magen- und Dünndarmschleimhaut. Die wasserlöslichen gruppenspezifischen Mucopolysaccharide sind im Gegensatz zur anderen Form hitzebeständig. Die Erblichkeit der Blutgruppen wurde kurz nach Landsteiner's Entdeckung erkannt. Epstein und Ottenberg (zit. 98) führten im Jahre 1908 die ersten Familienuntersuchungen durch. 1910 erschienen Arbeiten von v. Dungen und Hirschfeld (zit. 75), welche die mendelnde Vererbungsweise dieser biochemischen Strukturen aufdecken konnten. V. Dungen und Hirschfeld (zit. 75) entwickelten die sog. "2-Gen-Hypothese". Diese Hypothese besagt, dass die isoagglutinablen Eigenschaften A und B unabhängige, dominante Merkmale sind, denen das Fehlen dieser Strukturen, also a und b gegenübersteht. Auch a und b sollen als zwei unabhängige Allele vererbt werden. Nach dieser aus Beobachtungen geschlossenen und von Ottenberg (zit. 98) erstmals formulierten Gen-Hypothese zweier voneinander unabhängiger Agglutinine A und B werden die Gene in verschiedenen Chromosomen angeordnet gedacht. Gen-Strukturen und -Kombinationsmöglichkeiten nach der 2-Gen-Hypothese von v. Dungen, Hirschfeld und Ottenberg (zit. 75) :

	a	A	a	A
	b	b	B	B
a	aa	aA	aa	aA
b	bb	bb	bB	bB
A	Aa	AA	Aa	AA
b	bb	bb	bB	bB
a	aa	aA	aa	aA
B	Bb	Bb	BB	BB
A	Aa	AA	Aa	AA
B	Bb	Bb	BB	BB

Im Gegensatz zu dieser Theorie wurde 1924 von dem Mathematiker Bernstein die "3-Gen-Theorie" entwickelt (zit.75). Nach dieser Theorie gibt es drei allele Gene, die je nach dem als A, B und O oder aber als I^A , I^B und I^O bezeichnet wurden. (Der Buchstabe I wurde gewählt, da die ABO-Blutgruppenbestimmung auf einer Isoagglutination beruht).

Die Gene A und B sind dominant über O (22). Den vier Blutgruppen entsprechend gibt es also die folgenden 6 Genotypen(98):

Blutgruppe	Genotyp
O	$I^O I^O$
A	$I^A I^A$, $I^A I^O$
B	$I^B I^B$, $I^B I^O$
AB	$I^A I^B$

In Tabelle 3 werden Gen-Strukturen und -Kombinationsmöglichkeiten nach der 3-Gen-Hypothese von Bernstein dargestellt (zit. 75):

Tabelle 3

	O	A	B
O	O O	O A	O B
A	A O	A A	A B
B	B O	B A	B B

Da die Bernstein'sche Hypothese nach den besonders von F i s c h e r (zit. 75) durchgeführten kritischen Vergleichen mit den tatsächlichen Beobachtungen übereinstimmte, hat sie sich langsam durchgesetzt. Wichtig waren dabei statistische Berechnungen über das zahlenmäßige Vorkommen der Blutgruppenmerkmale in einer bestimmten Population.

Dazu Tabelle 4, welche eine statistische Überprüfung der Theorie Bernsteins (zit. 98) bringt.

Tabelle 4

	Gruppenfrequenz				Zahl
	O	A	B	AB	
Engländer	0,464	0,434	0,072	0,031	500
Franzosen	0,432	0,426	0,112	0,030	500
Italiener	0,472	0,380	0,110	0,038	500
Neger-Afrika	0,432	0,224	0,292	0,050	500

R a s c h (75) erhielt folgende Werte für die Bevölkerung Mitteleuropas:

O = 36,82 %
A = 42,47 %
B = 14,14 %
AB = 6,57 %

Bestimmbarkeit der Blutgruppen:

Die blutgruppenspezifischen Eigenschaften der Erythrozyten sind schon bei drei Monate alten Foeten nachweisbar, während die Serum-eigenschaften beim Neugeborenen noch nicht voll ausgebildet sind (98). Die Blutgruppen bleiben während des ganzen Lebens unverändert, unbeeinflusst durch Alter, Nahrung, Strahleneinflüsse oder Krankheit (22). R a s c h (75) untersuchte die Blutgruppenverteilung bei 243 Fällen von chronischer Polyarthrits. Dabei betrug der %-Anteil der einzelnen Blutgruppen:

Blutgruppe	%-Anteil
O	32,51
A	42,80
B	18,11
AB	6,58

Die ABO-Blutgruppen können nach verschiedenen Methoden bestimmt werden. Nach der Landsteiner'schen Regel sind in einem Blut nur verträgliche Agglutinine vorhanden. Die Vermischung von Erythrozyten und Serum verschiedener Gruppen ergibt demnach folgende verschiedene Reaktionsbilder (22):

Serum der Gruppen:	Erythrozyten der Gruppen :				
	A	B	AB	O	
A β					
B α					Agglutination
AB					
O $\alpha\beta$					Keine Reaktion

Im Prinzip stellt obiges Schema die Gruppenbestimmungen durch Agglutinationsproben dar. Die gebräuchlichsten Methoden dieser Art sind nach D a h r (22):

Die Objektträgermethode. Hierbei werden gewöhnliche oder Milchglas-Objektträger verwendet, auf welche je ein Tropfen Testserum A β , B α und O $\alpha\beta$ aufgetropft werden. Als negatives Kontrollserum wird meist noch ein Tropfen AB-Serum aufgebracht. Zu jedem Serumtropfen wird je ein Tropfen der zu untersuchenden Erythrozytenaufschwemmung zugesetzt. Die Agglutination kann mit bloßem Auge abgelesen werden.

Die Röhrenmethode. Die Testseren werden in Röhren von gewöhnlich 80 mm Länge und 8 mm lichter Weite gebracht. Nach Zugabe der zu untersuchenden Erythrozyten kann die Ablesung nach Zentrifugieren, nach Brutschrankaufenthalt oder nach 4stündigem Stehen bei Zimmertemperatur erfolgen.

Die Kapillarmethode. Sie wurde 1930 von P o n s o l d (22) entwickelt. Dabei erfolgt die Agglutination in Kapillarröhren von 10 cm Länge und 3/4 mm lichter Weite. Bei dieser Methode kann das Ergebnis nach einer halben Stunde abgelesen werden. Die Agglutinate können gut erkannt werden, da sie sich in den Kapillaren perlschnurartig aneinanderreihen.

Ausser diesen gebräuchlichsten Bestimmungsmethoden, die auf der Agglutination beruhen, entwickelte 1939 M. S a n d e r (zit. 22) eine Blutgruppenbestimmung als Senkungsreaktion. Die Test-Serum-

Erythrozyten-Gemische werden in Westergreen-Pipetten aufgezogen und die Agglutination als Senkung abgelesen.

1941 wurden erstmals von W a g n e r (zit.26) Karten mit trockenen Testseren beschrieben, um die ABO-Gruppenbestimmung zu erleichtern. 1951 wurden Ergebnisse mit diesen Karten veröffentlicht. Die Karten von Wagner konnten sich aber nicht durchsetzen. E l d o n (26) führt dies auf die Tatsache zurück, dass die Blutkörperchen auf diesen Karten die Tendenz zeigen, Geldrollen zu bilden, die es erschweren, eine negative von einer schwach positiven Reaktion zu unterscheiden. 1950 wurden von E l d o n (26) Karten entwickelt, die eine zuverlässige Bestimmung der ABO- und Rh-Gruppen erlauben.

Gc - Gruppen

Vor wenigen Jahren wurden mehrere neue Serum-Proteine entdeckt und zwar mit Hilfe von elektrophoretischen und immunologischen Techniken. Besondere Bedeutung erlangten die Immunoelktrophorese und die Stärke-Gel-Elektrophorese, welche erstmals von S m i t h i e s (86) beschrieben wurde. Mit diesen Methoden konnten ungefähr 20 Proteine im menschlichen Normalserum gefunden werden (46,42). 1959 entdeckte H i r s c h f e l d (46) bei immunoelktrophoretischen Untersuchungen an menschlichen Blutseren einen Polymorphismus einer bestimmten Protein-Gruppe im Bereich des α_2 -Globulins, der die Einteilung der Seren in drei verschiedene Gruppen ermöglichte. Die von Hirschfeld verwandte Methode war die Immunoelktrophorese und zwar die Mikromodifikation nach S c h e i d e g g e r (77). Sie ist heute noch die einzige verlässliche Methode, um diese Gruppen zu bestimmen (51). Die für diese Proteingruppe spezifische Komponente nannte H i r s c h f e l d (46) Gc ("group specific component"). Die einzelnen Typen des Gc-Systems sind folgendermassen zu differenzieren:

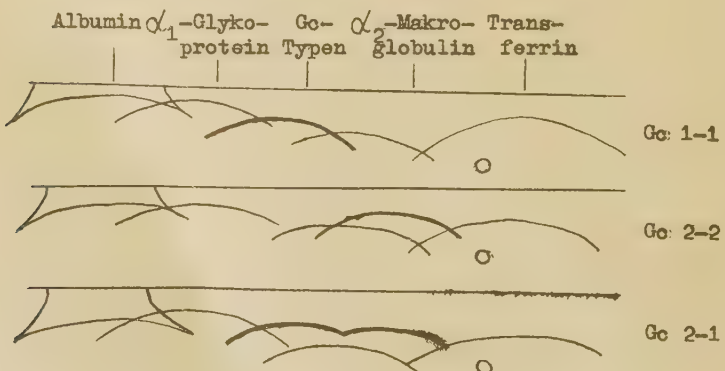
- 1) In 56% der von Hirschfeld untersuchten Stichproben aus Schweden fand sich zwischen dem Albumin und dem α_2 -Makroglobulin

ein halbkreisförmiger, gleichmässig gekrümmter Präzipitatbogen. Seine Lage (bedingt durch eine grosse Diffusionsgeschwindigkeit im Agar-Gel 51) befand sich relativ weit auf der Anodenseite. Diesen Typ nannte Hirschfeld Gc 1-1.

- 2) Hirschfeld fand einen weiteren Typ, dessen Wanderungsgeschwindigkeit im Vergleich zum Typ Gc 1-1 erheblich langsamer ist. Die Präzipitatlinie ist auch hier gleichmässig gebogen, sie deutet wieder auf ein Diffusionszentrum hin, was eine homogene Proteinfraction bedeutet (51). Die Häufigkeit dieses Typs beträgt rd. 7%. Hirschfeld nannte ihn Gc 2-2.
- 3) Anstelle der gleichmässig gekrümmten Präzipitatlinien findet sich bei ungefähr 37% (Hirschfeld 46) ein langgestrecktes Präzipitat, das die Bereiche der beiden anderen Typen überspannt. In günstigen Fällen erscheint es aus den für Gc 1-1 und Gc 2-2 charakteristischen Präzipitaten zusammengesetzt. Diese zwei Maxima weisen darauf hin, dass dieser Typ zwei Diffusionszentren besitzt, also nicht homogen ist. Hirschfeld bezeichnet ihn als Gc 2-1.

Abbildung 1 macht die Lage der Präzipitattbögen des Gc-Systems deutlich (Hirschfeld 46).

Abb. 1



Versuche mit Mischungen verschiedener Seren zeigten(47),dass eine Mischung des Typs Gc 1-1 mit Gc 2-2 zu gleichen Mengen ein Immuno-
elektrophorese-Muster mit zwei Maxima ergibt,das von einem reinen Serum vom Typ Gc 2-1 nicht zu unterscheiden ist.Diese Experimente mit Mischungen zusammen mit genetischen Studien lassen vermuten,dass es zwei elektrophoretisch verschiedene,immunologisch aber gleiche präzipitatbildende Komponenten im menschlichen Serum gibt (H i r s c h f e l d 46). Alle drei Typen haben ihre Präzipitatbögen nahe der Antikörperauftragsstelle.

Ausser dem Gc-System liegen noch andere Komponenten im Bereich der α_2 - Globulinfraktion,wie Tabelle 5 nach H i r s c h f e l d (46) zeigt:

Tabelle 5

1) Schnellwandernde Komponenten	α_2 - Globulin Gc 1-1 (nur in bestimmten Seren) Hp 1-1 (nur in bestimmten Seren)
2) Komponenten mit mittlerer Laufgeschwindigkeit	α_2 - Lipoprotein α_2 - Makroglobulin Zoeruloplasmin Hp 2-1 (nur in bestimmten Seren) Hp 1-1 + Hb (nur in " ") Gc 2-1 (nur in " ")
3) Langsam wandernde Komponenten	Gc 2-2 (" " " ") Hp 2-2 (" " " ") Hp 2-1 + Hb (nur in " " " ") Hp 2-2 + Hb (" " " ")

Die schnellwandernden Komponenten sind als Proteine definiert,die ihre Diffusionszentren anodenwärts liegen haben;die langsam wandernden Komponenten haben dagegen ihre Maxima auf der Kathodenseite,und zwar beide in Bezug auf das Diffusionszentrum des α_2 - Makroglobulins.Die Präzipitate der Komponenten mit mittlerer Laufgeschwindigkeit haben ungefähr dieselbe Lage wie das α_2 - Makro-

Bei Verwendung eines vollständigen Antihumanserums werden die Präzipitate aller angegebenen Proteine erhalten. Bei den polymorphen Systemen wird jeweils nur ein Typ erhalten. Für die Differenzierung der Gc-Typen ist eine genaue Kenntnis aller in ihrem Bereich liegenden Präzipitate nötig. Die Präzipitate von α_2 -Lipoprotein und α_2 -Zeruloplasmin stören nicht, da sie auf Grund einer relativ geringen Diffusionsgeschwindigkeit der Antigene verhältnismässig weit vom Zentralkanal entfernt liegen.

Das Präzipitat des anodisch meist etwas hakenförmig aufgebogenen α_2 -Makroglobulins liegt zwischen diesen beiden Bögen und dient als Anhaltspunkt für die Laufweite (51). Schwierigkeiten könnten sich bei der Abgrenzung gegen die Hp-Gruppen ergeben, da es sich auch hier um ein polymorphes System handelt. Wie aus Tabelle 5 deutlich wird, sind die Phänotypen des Hp-Systems ähnlich denen des Gc-Systems. In der Immunelektrophorese weisen Seren, die zum Typ Hp 1-1 gehören, ein gestrecktes Präzipitat in der α_2 -Globulinfraktion auf. Hp 1-1 ist ein schnellwandernder Typ, sein Diffusionszentrum liegt nahe beim Zentralkanal.

Seren des Typs Hp 2-2 ergeben einen gleichmässig gekrümmten Präzipitatbogen; es handelt sich um eine langsam wandernde Fraktion. Schliesslich ergeben Seren, die zum Typ Hp 2-1 gehören, ein langgestrecktes Präzipitat. Dieses Präzipitat befindet sich in seiner immunoelktrophoretischen Lage zwischen den Typen Hp 1-1 und Hp 2-2. Die Haptoglobine und die Gc-Gruppen können folgendermassen unterschieden werden:

- 1) Die Haptoglobine können Hämoglobin binden und transportieren, was mit der Benzidin färbung kenntlich gemacht werden kann (46 Hirschfeld). Die Gc-Gruppen besitzen diese Eigenschaft nicht.
- 2) Wird dem Serum Hämoglobin zugefügt, ändern die Gc-Gruppen ihre elektrophoretische Position nicht, während Haptoglobin mit Hämoglobin einen Komplex bildet, der nicht so weit anodenwärts wandert, wie freies Haptoglobin (42).
- 3) Auf Grund ihrer etwas grösseren Diffusionsgeschwindigkeit im

Agar-Gel befinden sich die Präzipitate des Gc-Systems näher am zentralen Kanal als die Haptoglobin-Präzipitate, so dass sie an dieser morphologischen Eigentümlichkeit erkannt werden können (42,51).

- 4) Die Haptoglobine unterscheiden sich immunologisch von den Gc-Typen; die elektrophoretisch unterschiedlichen Komponenten innerhalb eines Systems sind jedoch immunologisch identisch. Daraus ergibt sich, dass mit spezifischen Antiseren die einzelnen Muster unabhängig von einander entwickelt werden können (46).
- 5) Mit absorbierenden Agentien (Albumin 70 mg/ml + Properdin 1,7 mg/ml) kann man die Bildung von Hp-Präzipitaten verhindern, so dass im fraglichen Bereich nur die Phänotypen des Gc-Systems erscheinen (51).

Über die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Gc-Systems ist bis jetzt kaum etwas bekannt. Sicher dürfte es sein, dass es sich nicht um ein Mucoprotein handelt (3). Die Lage der einzelnen Gc-Typen bei der Gel-Diffusionsmethode ist nahe dem Diffusionszentrum der Antikörper, was auf ein niedriges Molekulargewicht schließen lässt. Die Eiweisskörper des Gc-Systems diffundieren jedoch nicht durch eine Dialysiermembran (47). In der Ultrazentrifuge hat die Fraktion, der dieses Protein angehört, eine Sedimentationskonstante von 4 S (C l e v e und B e a r n 21). Untersuchungen der Reproduzierbarkeit der Gc-Bestimmungen wurden hauptsächlich von C l e v e und B e a r n (21) und H i r s c h - f e l d (46) durchgeführt. Cleve und Bearn untersuchten die Gc-Typen unter verschiedenen Bedingungen. Ein Serum wurde wiederholt innerhalb von 9 Monaten getestet. Mehrere Serumproben desselben Probanden wurden getestet, nachdem sie 2 Jahre lang bei -15°C gelagert worden waren. In beiden Fällen wurde keine Änderung der Phänotypen beobachtet. Verunreinigte Seren, oder solche, die längere Zeit bei Zimmertemperatur gelagert worden waren, zeigten Änderungen im Immunelektrophorese-Muster, insbesondere traten

Änderungen der elektrophoretischen Mobilität oder Änderungen der Präzipitatlinien auf. Unter solchen Umständen ist keine exakte Bestimmung der Gc-Typen möglich. H i r s c h f e l d (46) kam zu ähnlichen Ergebnissen. Zwei Seren des Typs Gc 1-1 und Gc 2-2 wurden in mehr als 1 000 immuno-elektrophoretischen Analysen untersucht, und zwar innerhalb von 2 Jahren. Als Antiseren wurden Antihumanseren verwendet, die von Kaninchen, Pferden, Schafen und Mäusen gewonnen waren. Es zeigte sich keine Änderung der Gc-Typen. In anderen Versuchen wurden Blutproben ein und desselben Probanden in verschiedenen Zeitabschnitten (auch in Abhängigkeit von Mahlzeiten) untersucht (39), Es wurde immer das gleiche Muster gefunden.

Aus diesen Untersuchungen ist zu ersehen, dass die Gc-Bestimmungen eine hohe Reproduzierbarkeit besitzen. Die Gc-Typen scheinen sich nicht durch lange Lagerung der eingefrorenen Seren, durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Seren oder durch die Verwendung verschiedener Antiseren zu verändern. Auch bleibt das Muster gleich in wiederholt abgenommenen Blutproben desselben Probanden. Die Zuverlässigkeit der Gc-Bestimmungen ist u.a. abhängig von der technischen Durchführung der Tests, von den verwendeten Immunsereen, von den untersuchten Seren und von den möglicherweise auftretenden atypischen Mustern.

In der Weltliteratur wurden bisher unter rd. 8 000 veröffentlichten Bestimmungen nur 3 Seren gefunden, die auch bei wiederholter Untersuchung nicht eindeutig einem der drei Grundtypen zugeordnet werden konnten. H i r s c h f e l d (46) fand einmal entweder ein ausgedehntes Präzipitat, dessen Maximum näher der Kathode lag, als es beim gewöhnlichen Typ Gc 1-1 der Fall wäre, oder ein symmetrisches Präzipitat mit zwei Maxima. In letzterem Falle nimmt das weiter gewanderte Maximum die gleiche elektrophoretische Lage ein, wie das Präzipitat Gc 1-1. Aber das

langsamer gewanderte Maximum befand sich zwischen Gc 1-1 und Gc 2-2 und nicht, wie es bei Gc 2-1 der Fall gewesen wäre, im Bereich von Gc 2-2. Ein ähnliches Muster wurde unabhängig von Hirschfeld auch von R e i n s k o u (zit. 46) beobachtet. Dieser Serumtyp kann durch das Vorkommen einer weiteren gruppenspezifischen Komponente (Gc X) erklärt werden. Hirschfeld bezeichnet diesen Typ als Gc 1-X. Ein ähnliches atypisches Muster wurde in einem afrikanischen Serum gefunden. Das Muster zeigt ein langgestrecktes oder zweigipfeliges Präzipitat, wobei der langsamer gewanderte Anteil dem gewöhnlichen Gc 1-1 entsprach. Analog dem ersten atypischen Muster nannte Hirschfeld dieses Gc 1-Y. Die Abgrenzung dieser extrem seltenen Typen gegen die normalen Typen ist ausserordentlich schwierig.

Das Gc-System scheint in keinem Zusammenhang mit den Blutgruppen zu stehen, wie aus Tabelle 6 von H i r s c h f e l d und B e c k m a n n (47) hervorgeht.

Tabelle 6

	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2
A ₁	26	19	2
A ₂	2	7	0
B	7	5	0
A ₁ B	4	2	0
A ₂ B	0	0	1
O	30	14	3

Was die Serum-Gruppen betrifft, so sind die Gc-Gruppen mit den Gm - Gruppen, mit Cholinesterase, Transferrin und mit Coeruloplasmin weder identisch noch eng verwandt (46, 47). Auch mit den Hp-Gruppen ist das Gc-System nicht identisch (39). Der Beweis wurde mit Seren erbracht, bei denen weder in der Stärke-Gel-Elektrophorese noch mit der Immunoelktrophorese Hp-Gruppen nachweisbar waren.

Bei der Verwendung von Anti-Gc-Seren bildeten sich jedoch Präzipitatlinien aus, die zum Gc-System gehörten.

Die Reproduzierbarkeit und die Konstanz der Gc-Gruppen liessen die Vermutung zu, dass diese verschiedenen Muster genetisch gesteuert sind. Zu derselben Annahme führen die deutlichen Unterschiede, die man durch das Vorhandensein zweier, elektrophoretisch verschiedener, immunologisch aber identischer Komponenten erklären kann. Die Komponenten können getrennt auftreten (Gc 1-1 und Gc 2-2) oder zusammen (Gc 2-1). Nach diesen Gesichtspunkten stellten 1960 Hirschfeld, Jonsson und Rasmussen (48) eine Erbhypothese für den Gc-Faktor auf. Sie nehmen einen autosomal - intermediären Erbgang durch zwei Allele (Gc^1 und Gc^2) an. Gc 1-1 und Gc 2-2 sind demnach die den homozygoten Genotypen (Gc^1/Gc^1) und (Gc^2/Gc^2) entsprechenden Phänotypen, während der Phänotypus Gc 2-1 Ausdruck für die Heterozygotie (Gc^1/Gc^2) ist. Tabelle 7 veranschaulicht die Zuordnung von Phänotyp und Genotyp.

Tabelle 7

Phänotyp	Genotyp
Gc 1-1	Gc^1/Gc^1
Gc 2-2	Gc^2/Gc^2
Gc 2-1	Gc^2/Gc^1

Diese Hypothese wird gestützt durch Familienuntersuchungen, wie Tabelle 8 (nach Jensen 51) zeigt.

Tabelle 8

Eltern			Anzahl der Kinder mit dem Typus			
Gc	Go	N	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	N
1-1	x 1-1	32	63	—	—	63
1-1	x 2-1	67	73	52	—	125
1-1	x 2-2	9	—	12	—	12
2-1	x 2-1	18	11	14	9	34
2-1	x 2-2	6	—	8	4	12
2-2	x 2-2	—	—	—	—	—
Gesamt:		132	147	86	13	246

Auch Untersuchungen über Mutter-Kindverbindungen bekräftigen diese Erbhypothese. H i r s c h f e l d (46) hat darüber in Schweden Untersuchungen durchgeführt und das Ergebnis in nachstehender Tabelle (9) veröffentlicht.

Tabelle 9

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Kindes			Gesamt
	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	
Gc 1-1	219	96	—	315
Gc 2-1	94	98	35	227
Gc 2-2	—	30	10	40
Gesamt:	313	224	45	582

Ebenso lieferte die Zwillingsforschung wertvolles Material. Arbeiten auf diesem Gebiet liegen vor von C l e v e und B e a r n (21), J e n s s e n (51) und H i r s c h f e l d (46).

Bei Mutter-Kinduntersuchungen wurde festgestellt, dass bereits bei der Geburt die Bestimmung der Gc-Typen möglich ist, im Gegensatz zu anderen Komponenten der α_2 -Globulinfraktion (46). Die Häufigkeiten der Gc-Allele scheinen nicht mit Alter und Geschlecht zusammenzuhängen, wie Tabelle 10 (46) zeigt.

Tabelle 10

Geschlecht	Gc ¹	Gc ²	N
Männer	0,72	0,28	88
Frauen	0,74	0,27	582
Kinder	0,73	0,27	582
Nabelschnurseren	0,75	0,25	40

Tabelle 11 zeigt die Allelenhäufigkeiten in den bisher untersuchten Populationen (zit.51).

Tabelle 11

Popuulation	Gc ¹	Gc ²	N	Autor
Schweden	0,744	0,256	1 744	Hirschfeld
Lappen	0,874	0,126	79	Hirschfeld
Norwegen	0,724	0,276	383	Reinskou
England	0,714	0,286	49	Hirschfeld
Dänemark	0,769	0,231	126	Mansa Olsen
Deutschland	0,739	0,261	719	Jenssen
USA (Weisse)	0,717	0,283	122	Cleve, Bearn
Eskimo	0,701	0,299	67	Cleve, Bearn
Neger (Jamaika)	0,938	0,062	24	Hirschfeld
Neger (USA)	0,892	0,108	144	Cleve, Bearn
Neger (Afrika)	0,909	0,091	288	Hirschfeld
Indianer (Navajos)	0,977	0,023	245	Cleve, Bearn
Chinesen (USA)	0,760	0,240	117	Cleve, Bearn

Aus Tabelle 11 geht hervor, dass bei den Europäern sowie bei der weissen Bevölkerung der USA (Abkömmlinge von Europäern) eine relativ gleiche Allelenhäufigkeit angetroffen wird. Eine Ausnahme bilden die Lappen mit einer geringfügigen Erhöhung der Gc¹ - Allelenhäufigkeit (über 0,80). Weit deutlicher ist die Erhöhung der Gc¹ - Allelenhäufigkeit bei Indianern (Navajos) und Neger aus Afrika und Jamaika. Unter 0,90 liegt die Häufigkeit bei untersuchten Negergruppen aus USA, was mit einer Vermischung mit der weissen Bevölkerung zu erklären ist.

Untersuchungen des Gc-Systems in Deutschland, hauptsächlich im bayerischen Raum, liegen bis jetzt von B a i t s c h und J e n s s e n (3) vor. Phänotypen und Allelenhäufigkeiten für das Gc-System bei 208 bayerischen Blutspendern zeigt Tabelle 12 (3).

Tabelle 12

Phänotypenhäufigkeit			Allelenhäufigkeit	
Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	Gc ¹	Gc ²
119 (57,1%)	68 (32,8%)	21 (10,1)	0,736	0,264

Prinzipien und Techniken

immunoserologischer Untersuchungen

Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmals eine Präzipitin-Reaktion zwischen bakteriellen und nichtbakteriellen Antigenen und dem entsprechenden Antiserum beschrieben (K r a u s 59). Um 1910 entdeckten C a l m e t t e und M a s s o l (19) eine spezielle Art der Präzipitin-Reaktion, den sog. Flockungstest. Diese Reaktionen beruhen auf Antigen-Antikörperreaktionen. Antigene sind meist Makromoleküle oder genauer Eiweisskörper, die für den Organismus, der die Antikörper bilden soll, Fremdeiweisskörper darstellen. Daneben gibt es kleine Moleküle, oder körpereigene Substanzen, die antigenen Charakter haben können. Die Eigenschaften der Antikörper sind genauer bekannt. Sie können z.T. rein dargestellt werden. Nach G r a b a r (31) beträgt ihr Molekulargewicht zwischen 150 000 und 180 000, bei manchen bis zu 1 000 000.

Die Antikörper haben nicht alle dieselbe elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit. Die Mehrzahl von ihnen wandert elektrophoretisch ungefähr so schnell wie die γ -Globuline, andere wie die β -Globuline. Die Antikörper können nicht von "normalen" γ -Globulinen unterschieden werden. Nur die Tatsache, dass ein Antikörper spezifisch mit seinem homologen Antigen reagiert, erlaubt eine solche Unterscheidung.

Über die Ursachen endogener Antigenität gibt es nach G r a b a r (31) folgende Theorien:

Unter dem Einfluss einer Infektion oder einer sonstigen Schädigung werden normale endogene Zellbestandteile modifiziert. Denaturiertes Eiweiss ist für den Körper, aus dem es stammt, ein Antigen. Zahlreiche, besonders mit Hilfe radioaktiver Isotope durchgeführte Untersuchungen haben bewiesen, dass die Antikörper nicht präexistierende Globuline sind, die durch das Antigen umgebildet

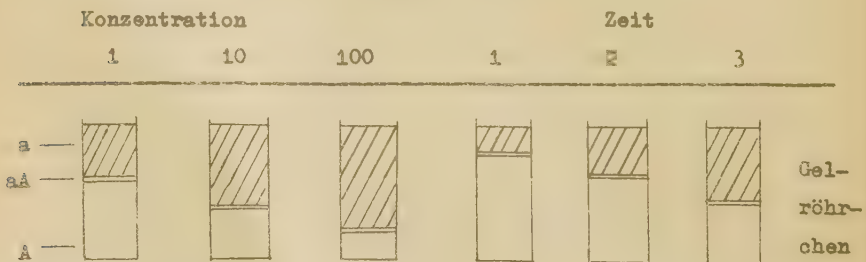
werden, sondern dass sie de novo in den Zellen des RES aufgebaut werden. Die Synthese der Antikörper erfolgt mit Sicherheit in den Plasmazyten (31).

Zur Bestimmung dieser Antigen-Antikörperreaktionen wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Der Gebrauch von Gel-Medien setzte sich besonders durch. Er wurde erstmals 1905 von B e c h h o l d (8) beschrieben. Seither wurden von mehreren Autoren Experimente mit Gel veröffentlicht, um den sog. "Ringtest" von U h l e n h u t (94) weiter zu entwickeln, der an und für sich Scheibentest genannt werden müsste, da dem Präzipitat an der Grenzschicht zweier Flüssigkeiten in einem Röhrchen entspricht, wobei die eine Flüssigkeit das Antigen, die andere die Antikörper enthält.

Eine bessere Kenntnis des Mechanismus der Präzipitations-Reaktion machte es in den folgenden Jahren möglich, dass mehrere spezifische Präzipitationsmethoden in Gel entwickelt wurden.

1946 veröffentlichte O u d i n die einfache Diffusionsmethode (66,67). Er verwandte Röhren mit Agar-Gel. Im Gel befanden sich die Antikörper in einer relativ niedrigen Konzentration. Auf die Gel-Säule wurde anschliessend das Antigen in hoher Konzentration geschichtet. Die Lage der sich ausbildenden Präzipitate ist abhängig von der Zeit der Diffusion und ausserdem von der Konzentration des Antigens, wie Abbildung 2 (66) veranschaulicht.

Abb.2



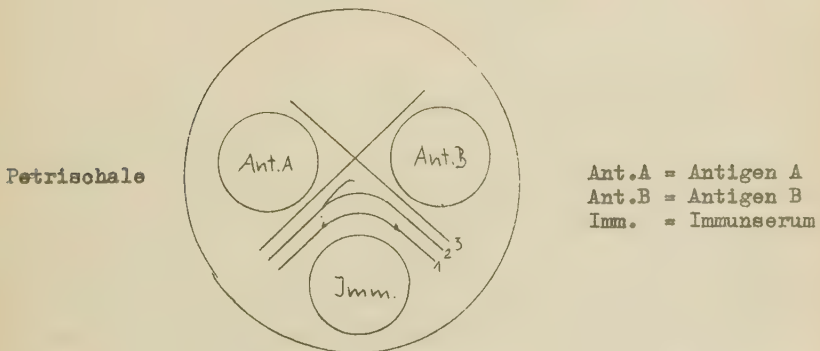
a = Antigenlösung; aa = Präzipitat; A = Antikörper im Gel

Die gleiche Methode wurde auch bei der Identifizierung von sog. komplexen Systemen angewandt. Die Antikörper dieses Systems haben dabei eine verschiedenartige Spezifität, die entsprechenden Antigene müssen vorhanden sein.

Unabhängig hiervon entwickelte O u c h t e r l o n y (69,70,71) eine Doppeldiffusionsmethode, wobei er Agarplatten in Petrischalen verwandte. Mit Hilfe der Doppeldiffusionsmethode in Agarplatten kann nicht nur die Zahl der präzipitatbildenden Systeme bestimmt werden, sondern es können auch Antigene, die sich in verschiedenen Lösungen befinden, verglichen werden. In der Originaltechnik von O u c h t e r l o n y (68) wurden Löcher in verschiedener Anordnung in das Agar-Gel gestanzt. Eines davon wurde mit Immunserum, zwei weitere mit verschiedenen Antigenlösungen gefüllt. Abbildung 3 zeigt drei mögliche Muster (68):

- 1) Identität der Antigene; die Präzipitationslinie verläuft kontinuierlich.
- 2) Kreuzreaktion der Antigene; an der Verbindungsstelle der beiden Linien ist eine Abweichung zu erkennen.
- 3) Verschiedene Antigene; die Linien kreuzen sich, ohne sich zu verbinden.

Abb. 3



Der Anwendungsbereich dieser Methoden ist jedoch ziemlich begrenzt. Zwei Linien oder Zonen können zusammenfliessen, was die Differenzierung erheblich erschwert. In einigen Fällen, besonders bei einem grossen Überschuss eines der beiden Reaktionspartner kann sich eine Linie oder Zone, die durch ein einziges Antigen-Antikörpersystem hervorgerufen wurde, in mehrere Linien aufspalten, wie es von B u r t i n, K a m i n s k i und unlängst von J e n n i n g s (zit. 30) gezeigt werden konnte. Die Ursache dieser Spaltungen ist noch nicht bekannt.

Eine weitere Schwierigkeit tritt bei zusammengesetzten Gemischen auf. Wenn die Zahl der Einzellinien gross ist, ist es sehr schwer, die Linien zu identifizieren (30).

Neben den verschiedenen Methoden, welche auf Präzipitationsreaktionen von Proteinen beruhen, wurde zur Trennung und Charakterisierung von Proteingemischen die Elektrophorese entwickelt. Im Prinzip beruht sie darauf, dass Teilchen mit verschiedener Ladung im elektrischen Feld verschieden schnell zur Anode bzw. Kathode wandern. Die Serumproteine sind in Lösung Ampholyte, d.h. sie tragen positive und negative Ladungen. Das Verhältnis dieser Ladungen ist vom p_H -Wert der Lösung abhängig.

Gewöhnlich wird die elektrophoretische Trennung der Serumproteine in einem schwach alkalischen Milieu durchgeführt, d.h. auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes sämtlicher Serumproteine. Die Abspaltung von H^+ -Ionen wird dabei gefördert, die Proteine sind negativ geladen und wandern zur Anode (101). Eine unterschiedliche elektrische Nettoladung, die dem jeweiligen Dissoziationsgrad entspricht, ist Voraussetzung für die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (23).

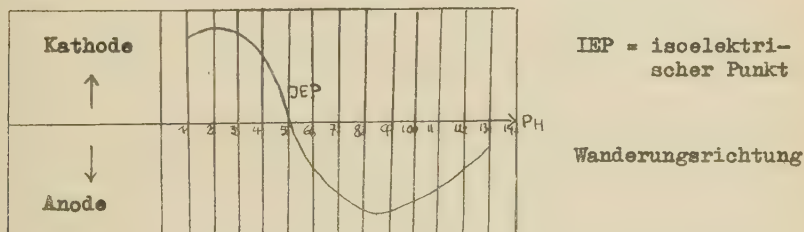
1938 wurde von T i s e l i u s (zit. 97) die sog. freie oder klassische Elektrophorese entwickelt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei dieser Methode in einer freien Pufferlösung. Kleinste Proteinmengen können jedoch mit der

freien Elektrophorese nicht getrennt werden, da ein minimaler Konzentrationsgradient zur Stabilisierung der Trennflächen unbedingt nötig ist (97). Diese Schwierigkeit kann man umgehen, wenn man das flüssige Medium durch ein anderes stabilisiert. So entsteht die Elektrophorese in einem Trägermedium, wobei der Träger des Puffergemisches Stärke, Filtrierpapier, Zellulosepulver, Silika-Gel oder auch Agar Gel sein kann.

Die Verwendung von Filtrierpapier, also die Papierelektrophorese, ist dabei am bekanntesten geworden. Die elektrophoretische Wanderung der Ionen im Filtrierpapier wird in erster Linie von ihrer Ladung und von der Stärke des Stromfeldes bestimmt.

Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der Wanderungsrichtung vom p_H -Wert der Lösung (W u h r m a n n und M ä r k i 101)

Abb. 4



Ferner ist die Form der Proteine und z.T. auch ihre Grösse von Bedeutung. Die Molekulargrösse ist allerdings nur von geringem Einfluss: Die α_2 -Makroglobuline mit einem Molekulargewicht von rd. 1 000 000 wandern gleich schnell wie die wesentlich kleineren Proteine der α_2 -Fraktion (101). Gegenüber der freien Elektrophorese hat nach W u n d e r l y (102) die Papierelektrophorese keinen wesentlichen Fortschritt gebracht, da auch mit ihrer Anwendung nur fünf Komponenten aus menschlichem Serum bekommen werden

können.

Zur Charakterisierung von Aminosäuren und Peptiden wurde die Hochspannungselektrophorese entwickelt. Bei der Niederspannungselektrophorese ergeben sich bei der Trennung von niedermolekularen Stoffen infolge einer langen Laufzeit durch Diffusion und andere Effekte verbreiterte Bande. Bei höherer Spannung ist dagegen die Wandungsgeschwindigkeit grösser, die Laufzeit geringer und die Trennung schärfer (78). Eine bessere Aufteilung der Serumproteine als mit der freien oder der Papierelektrophorese gelingt mit der Immunelektrophorese.

Durch Verbindung der Gel-Diffusionsverfahren mit der Elektrophorese im Agar-Gel haben G r a b a r und W i l l i a m s 1953 (32) ein physiko-chemisches Verfahren, die Immunelektrophorese, entwickelt. Diese Methode ist besonders zum qualitativen Nachweis von Proteinindividuen geeignet (79).

Bei diesem Verfahren wird das Gemisch zuerst einer Elektrophorese in durchscheinendem Gel unterworfen. Durch den elektrischen Strom werden die einzelnen Komponenten des Antigengemisches aufgetrennt. Nun wird ein Immunserum, das reichlich präzipitatbildende Antikörper enthält, in eine Rinne im Gel gegeben, die parallel zur Laufrichtung der Antigene verläuft. Die Antikörper diffundieren senkrecht zu dieser Achse, und wie in der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony bilden sich spezifische Präzipitatlinien in Form von Bögen aus, wenn Antigen und Antikörper aufeinander treffen.

Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung der Immunelektrophorese (Ouchterlony 70).

Abb. 5



A : Objektträger mit Gel beschickt. Die beiden Rinnen sind ausgestanzt. Die senkrechte Rinne ist mit Antigen beschickt.

A₁ : Gefärbtes Präparat A

B : Anlegen der Elektroden, Auftrennung des Proteingemisches in der Elektrophorese.

B₁ : Gefärbtes Präparat B nach der Elektrophorese.

C : Spezifisches Antiserum wurde in die Longitudinalrinne gebracht. Ausbildung der Präzipitatbögen.

Durch die oben beschriebene immunoelektrophoretische Serumanalyse konnten inzwischen im menschlichen Normalserum 18 Proteinindividuen durch spezifische Präzipitate charakterisiert werden (79), und zwar:

Zwei elektrophoretisch schneller als Albumin wandernde Vorkomponenten, das Albumin, drei α_1 -Globuline, fünf α_2 -Globuline, vier β_1 -Globuline, zwei β_2 -Globuline und das γ -Globulin.

S c h e i d e g g e r (77) entwickelte 1935 die sog. Mikromethode der Immunelektrophorese. Im Prinzip ist sie gleich der Originalmethode von Grabar und Williams. S c h e i d e g g e r (77) verwendet gewöhnliche Objektträger mit einer Agar-Gel-Schicht von ca. 1 mm. In der Standardmethode werden Spezialobjektträger mit einer 3 mm dicken Agarschicht benutzt. Im Gegensatz zur senkrechten Rinne bei der Makromethode befinden sich bei der Mikromethode runde Löcher im Agar, in welche die Antigene eingefüllt werden. Die Longi-

tudinalrinne ist kürzer als in der Standardmethode und befindet sich zwischen den ausgestanzten Löchern. In Tabelle 13 (Scheidegger 77) werden die Vorteile der Mikromethode nach Scheidegger gegenüber der Makromethode nach Grabar und Williams deutlich. Es wurde eine Analyse von Humanserum mit Hilfe eines Immunserums vom Pferd durchgeführt.

Tabelle 13

	Serum	Immunserum	Zeit	
	in ml	in ml	Elektrophorese	Diffusion
Standard M	0,05 - 0,2	0,5 - 1,0	6 Std. a 3V/cm	1 - 10 Tage
Mikro M	0,001	0,005	45 Min. a 6V/cm	1/2- 24 Std.

Diese Mikromodifikation nach Scheidegger hat sich schnell durchgesetzt, da sie nicht nur eine Materialersparnis erlaubt, sondern auch die Ergebnisse wesentlich schneller bringt.

Als wichtigste Registrierungsarten sind die Fixations-, Färb- sowie die photographischen Methoden zu nennen.

Um die Präparate deutlich sichtbar zu machen, ist eine Fixation notwendig. Ouchterlony verwendet eine Mischung von 6%igem Eisessig und 94 %iger Pikrinsäure, der p_H -Wert der Lösung beträgt 2 - 1 (zit. 11).

Nach der Fixation erfolgt meist eine Färbung der Präparate. Am häufigsten werden folgende Farbstoffe verwendet:

Amidoschwarz 10 B, Azokarmin B, Bromphenolblau, Lichtgrün F S und Azelinscharlach. Vorzugsweise werden wasserlösliche Stoffe verwendet, da diese Farbstoffe speziell Immunpräzipitate anfärben (Ouchterlony 71).

Auch selektiv färbende Reagentien werden verwendet, so z.B.

Sudan IV für Lipide und Lipoproteine, Perjodsäure (Schiff's oder Nadi's Reagens) für Glykoproteide, oder Alizarin für kupferhalti-

ge Proteine. Es ist jedoch oft schwierig, mit diesen selektiv-färbenden Stoffen klare, eindeutige Ergebnisse zu bekommen, die die Zusammensetzung der Präzipitate deutlich machen (71). Deshalb werden heute fast ausschliesslich die nicht selektiv-färbenden Farbstoffe verwendet.

Ausserdem wurde noch mit mit Isotopen gekennzeichneten Proteinen gearbeitet, um die Identifizierung zu erleichtern (1). Auch diese Methode konnte sich nicht durchsetzen.

Wichtig zu erwähnen sind auch die Photographie-Methoden, um die Präparate zu registrieren. Hierzu wurden verschiedene Verfahren ausgearbeitet (Ouchterlony 71).

Die Immunoelktrophorese bringt allerdings folgende Nachteile und methodische Schwierigkeiten mit sich:

Bei der Elektrophorese im Trägermedium kann das Trennobjekt mit dem Trägermedium eine physikalische oder chemische Reaktion eingehen (97).

Während des Durchganges des elektrischen Stromes wird Wärme entwickelt. Bei den meisten experimentellen Anordnungen verdunstet dabei Wasser, so dass von beiden Elektrodengefässen Pufferlösung angesaugt wird. Es bilden sich im Trennraum zwei von den Enden zur Mitte hin gerichtete Pufferströmungen, die in der Mitte die Intensität 0 und an beiden Enden ihren Maximalwert haben (Wieme 97).

Das Material des Gels, z.B. Agar, besitzt eine bestimmte elektrische Ladung. Das angelegte elektrische Feld ruft nun einen elektroendosmotischen Fluss im Gel hervor. Aber dieser elektroendosmotische Fluss scheint die Beweglichkeit der Antigene im Gel nicht zu beeinflussen (30).

Nach grundlegenden Untersuchungen von Svedberg und Sjögren (92,93) liegt das in der Ultrazentrifuge nachweisbare Stabilitätsoptimum der Plasmaproteine bei p_H 4 - p_H 9 für Serumalbumin und von p_H 4 - p_H 8 für Serumglobuline. Bei einer Vergleichsuntersuchung von Schultze und Schwick (79)

mit der Immunoelctrophorese geht hervor, dass in den Bereichen von p_H 10 - 12 und p_H 2,5 - 4,5 Abbauvorgänge eintreten, die entweder zu starken Veränderungen oder zum völligen Verschwinden einiger Proteinpräzipitate führen. Das α_2 - Makroglobulin wird z.B. bei p_H 12 und p_H 4,5 - 2,5 ohne Aufteilung der Präzipitation abgebaut, während bei p_H 6-10 keine Veränderungen zu beobachten sind.

Die Diffusion der Proteine ist im Agar-Gel gehemmt (97).

Die Wanderungsgewindigkeit einiger grosser Moleküle kann durch die Gel-Struktur herabgesetzt werden (30). Die elektrophoretische Beweglichkeit ist von der Agarsorte abhängig (97). Wenn das Gel sehr flüssigkeitsreich ist (98,5 - 99 %), ist die Beweglichkeit im elektrischen Feld fast die gleiche wie in einer reinen Flüssigkeit.

Das Trennvermögen ist nicht für alle Agarsorten gleich (Wie me 97).

Als wichtigste Vorteile der Immunoelctrophorese sind zu nennen: Das technische Verfahren ist einfach.

Es besteht die Möglichkeit, sogar zusammengesetzte Mischungen zu analysieren.

Jede der Komponenten kann auf Grund ihrer Beweglichkeit im elektrischen Feld identifiziert werden (30).

Änderungen und Aufspaltungen der natürlichen Komponenten, wie sie bei der gewöhnlichen Elektrophorese vorkommen können, sind bei dieser Methode ausgeschlossen.

Die Proteine können auf Grund der viel grösseren Empfindlichkeit der Immunoelctrophorese sicherer und leichter als mit der einfachen Elektrophorese bestimmt werden (Grabar und Williams (32)).

Eigene Untersuchungen

Versuchsreihe 1

Blutgruppenbestimmung mit Eldon-Testkarten

Material und Reagentien

1) Testkarte

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Kontrolle
Name:		Blutgruppe: (ABO)	Rh
Geb.am:		Datum:	Untersucher:
Adresse:			

Die Testkarte, bestehend aus Hartpappe, weist 4 Felder auf, die mit Cellophan überzogen sind. Auf drei der Felder befinden sich je 60 mm^l getrocknetes Antiserum, das Kontrollfeld enthält keine Antikörper.

Auf der Karte befinden sich weiter ein Feld für die Personalien des untersuchten Probanden und ein Feld für das Untersuchungsergebnis. Für alle vier Felder der Testkarte werden 100 ml Reagens verwendet. Diese 100 ml Reagens enthalten 10 ml Serum, 90 ml Dextran und 2 Tropfen einer 5%igen Heparin-Lösung. Dextran wird in einer wässrigen Lösung verwendet, die auf 1 000 ml Wasser 60 g Trockendextran und 9 g Natriumchlorid enthält.

Da auf den Testkarten getrocknete Seren bzw. Blutkörperchen verwendet werden, bildet sich ohne Zusatz die sog. Geldrollenanordnung der Erythrozyten aus, was eine Agglutination vortäuschen kann. Durch Dextran wird diese Pseudoagglutination verhindert. Ausserdem wird durch Dextran die Agglutination beschleunigt, so dass die Untersuchung bei Zimmertemperatur durchgeführt werden kann.

Weitere Wirkungen des Dextran sind, dass es inkomplette Seren aktiviert und ausserdem bindend wirkt, d.h. ohne Dextranzusatz würde sich das getrocknete Serum von der Unterlage abschälen. Wie Dextran bewirkt das Natriumchlorid eine Beschleunigung der Reaktion. Die optimale Konzentration des Natriumchlorid beträgt ungefähr 1 %. Der Heparinzusatz verhindert die Fibrinpräzipitation und die Gerinnung des Kapillarblutes.

Auf den meisten Materialien, wie z.B. Papier, Pergament, verschiedenen Kunststoffen und Glas werden die negativen Reaktionen unspezifisch positiv. Unter Verwendung von Cellophan jedoch werden die negativen Reaktionen vollkommen homogen.

2) Kunststoffstäbchen. Die Stäbchen weisen ein flaches und ein abgerundetes Ende auf, da sie sowohl zum Auffangen bzw. Abmessen des Kapillarblutes dienen, als auch zum Verreiben auf den Feldern. Der Durchmesser des flachen Endes beträgt 3,4 mm. Ein Blutstropfen auf dieser Fläche entspricht ungefähr 10 mm³.

3) Tropfpipette. Diese Pipette wird mit den Karten mitgeliefert und ist geeicht. Die senkrecht gehaltene Pipette ergibt eine Menge von 45 - 55 mm³ Wasser.

4) Zur Blutgruppenbestimmung werden ausserdem noch benötigt: Eine sterile Lanzette, eine Uhr, Watte und Leitungswasser.

Methodik

Mit der senkrecht gehaltenen Tropfpipette wird auf jedes Feld ein Tropfen Wasser aufgebracht, der mit dem Stäbchen sorgfältig verrieben wird, um das getrocknete Reagens zu lösen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Serum von einem Feld auf das andere übertragen

wird. Das Stäbchen muss also jedesmal gründlich gesäubert werden. Das Blut wird entweder aus dem Ohrläppchen oder einer Fingerbeere entnommen. Mit dem abgeflachten Ende des Stäbchens wird ein Blutstropfen aufgefangen, auf dem ersten Feld verrieben und verteilt. Nach Säubern des Stäbchens werden ebenso die übrigen Felder beschickt. Nach einer Minute wird die Karte drei Minuten lang nach allen Seiten gekippt, wobei sie jeweils 10 - 15 Sekunden in jeder Extremstellung gehalten werden soll. Anschliessend kann die Reaktion abgelesen werden.

Um die getrockneten Karten gegen Feuchtigkeit und Insekten zu schützen, können sie mit einem Celluloselack überzogen werden. Soweit die von Eldon (26) beschriebene Testkartenmethode.

Krankengut

Die Blutgruppen wurden bei Normalseren aus der Blutbank München und bei Patienten mit c.P. bestimmt. Die Patienten stammten aus der Rheumaambulanz der Medizinischen Poliklinik München und wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Latex-Test(pos.), CRP(pos.), BKS(erhöht), Gelenkbefall(kleine Gelenke). In Tabelle 14 sind die c.P.-Patienten aufgeführt, bei denen die Blutgruppen bestimmt wurden.

Tabelle 14

Fall	Geschlecht	Alter	Krankheits- Jahre dauer (Jahre)	Gelenkbefall +=kl. Gelenke	BKS	Latex- test	CRP
1	w	66	2,5	++, Knie, HWS, LWS	17/27	++	+
2	w	57	7	BWS	30/64	++	-
3	w	69	4	Knie	23/51	+	+
4	w	59	2	++	30/60	++	+
5	w	52	8	+++ , Knie	45/84	+	-
6	w	66	8,5	+++ , Knie	35/69	+++	+++
7	w	72	5	++	14/34	+	+
8	w	51	18	+++ , Knie	20/48	+++	+
9	w	55	2	+++	16/26	++	(+)
10	m	48	4	++ , Knie	15/42	++	+
11	m	64	7	+++ , Knie	34/64	+++	++
12	m	78	2	(+) HWS, BWS	2/5	+++	+
13	m	58	18	+++ , Knie	10/25	+++	++
14	m	58	20	+++ , Knie	21/49	+++	++
15	m	62	22	alle Gelenke	4/10	+	-
16	m	57	6	+++	16/33	++	+
17	m	69	2	+++ , Knie	14/34	+++	+

Ergebnisse

Tabelle 15 enthält die Ergebnisse der Blutgruppenbestimmung bei Normalseren.

Tabelle 15

Blutgruppe	Zahl	%
A	15	42,9
AB	0	0
B	3	8,5
O	17	48,6
Gesamt:	35	100

Tabelle 16 bringt die Werte, die bei der Blutgruppenbestimmung bei o.P.-Patienten gefunden wurden.

Tabelle 16

Blutgruppe	Zahl	%
A	5	29,4
AB	1	5,9
B	3	17,6
O	8	47,1
Gesamt:	17	100

Versuchsreihe 2

Gc-Typen-Bestimmung nach Hirschfeld

Material und Reagentien

Elektrophorese-Gerät mit Pufferkammern

Objektträger

Mikropipetten, 20 ml Pipette

Filtrierpapier Nr 5 703 (Schleicher, Schüll)

Brückenpuffer p_H 8,6 :

Veronal	6,9 g
Na-Veronal	43,8 g
Ca-Laktat	1,92 g
aqua dest.	ad 5 l

Gel-Puffer p_H 8,6 :

Veronal	4,98 g
Na-Veronal	31,53 g
Ca-Laktat	4,6 g
aqua dest.	ad 3 l

Cialit

Reinagar (Behringwerke)

Anti-Gc-Serum vom Pferd (Behringwerke)

Stanze (Antikörperrillenlänge 3,7 cm, Breite 1 mm)

Injektionsnadel Nr. 1,8

Amidoschwarz (eine Spatelspitze Amidoschwarz auf 500 com
Methanol-Eisessig-Gemisch 1:10)

Eisessig

Entfärber (2%ige Essigsäure 850 ml, Glycerin 150 ml)

Methodik

Der für die Immunelektrophorese verwandte Agar soll möglichst von Kalzium frei sein und ein weitgehend transparentes Gel von niedrigem Erstarrungspunkt geben. Durch gründliches Waschen der im Handel erhältlichen Agarsorten kann ein Agar von ausreichender Qualität erhalten werden. In einem ungewaschenen Agar ist z.B.

die elektrophoretische Wanderung der Proteine zur Anode gering und der grösste Teil der Proteine wandert infolge der erhöhten Elektrosmose zur Kathode (83) .

Die benötigte 1%ige Agarlösung stellt man wie folgt her. Ein Gramm Reinagar (bei diesem Spezialagar ist mehrfaches Waschen in aqua dest. nicht nötig) wird mit 50 ccm aqua dest. in einem verschliessbaren Erlenmeyerkolben im Wasserbad oder bei kleiner Flamme ca. 10 Minuten lang erhitzt.

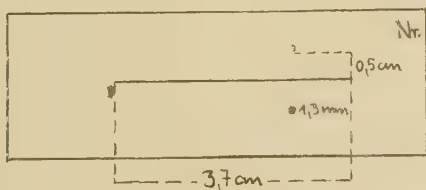
Zur Konservierung des Agar werden 1 : 10 000 g Cialit zugegeben. Es ist jedoch genau zu beachten, dass sich während des Erhitzens keine Blasen bilden, da ein Aufkochen die Qualität des Agar beeinträchtigen würde. Wenn sich die Agarflocken vollständig gelöst haben, kann die Pufferlösung erhitzt werden. Die Lösung besteht aus 33,2 ccm Stammlösung und 16,8 ccm aqua dest. Wenn die Temperatur der Lösung ungefähr 70° C erreicht hat, wird sie dem Agar beige-mischt. Das Agar-Puffer-Gemisch wird anschliessend unter leichtem Schütteln nochmals erhitzt.

Es hat sich bewährt, den Agar nach der Herstellung erst einmal erkalten zu lassen, und nach mindestens 14 Stunden unter vorsichtigem Erwärmen wieder zu verflüssigen und weiter zu verwenden. Die fertige Agarlösung ist in einem verschlossenen Gefäss mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar und braucht vor Gebrauch nur noch erhitzt zu werden. Es ist aber zu beachten, dass die gleiche Agarlösung nicht öfter als zweimal erwärmt werden soll.

Nachdem die Objektträger mit einem Diamantschreiber gekennzeichnet wurden, werden sie mit heisser Seifenlauge gründlich gereinigt, mit aqua dest. nachgespült und getrocknet. Die gesäuberten Objektträger werden auf eine waagrecht ausgerichtete Glasplatte mit dem Kennzeichen nach unten gelegt. Der Erlenmeyerkolben mit dem heissen Agar wird zweckmässig auf eine isolierende Platte gestellt, um ein zu schnelles Erkalten zu verhindern. Durch Aufsaugen und Ausblasen

des Agar mit einer 20 ml - Pipette wird diese erwärmt, und ein Verschluss der Pipette durch erstarrte Agarteilchen verhindert. Anschließend werden auf jeden Objektträger 2 ml Agar aufgetragen. Nach einigen Minuten ist das Agar-Gel fest, und die beschickten Objektträger können weiter verwendet oder in feuchten Kammern aufbewahrt werden. Die Kammern bestehen aus abgedeckten Glasplatten, deren Ränder mit einem 2 cm breiten, aqua dest. getränkten Schaumgummistreifen besetzt sind. In der Mitte liegt ein feuchtes Filtrierpapier, um das Abheben der Objektträger zu erleichtern. Die Objektträger werden auf ein Spezialträgerbänkchen aufgebracht, mit einem Stanzgerät wird eine Mittelrinne von 37 mm Länge und 1 mm Breite eingestantzt. Die Löcher für das Serum werden mit der Hand mit einer Injektionsnadel gestantzt. Einer Injektionsnadel (1,8) wurde zu diesem Zweck die Spitze abgesägt und das runde Loch oval gehämmert. Die Objektträger werden zum Stanzen der Löcher auf ein Filtrierpapier gelegt, auf welchem die Stanzstellen, wie Abbildung 6 zeigt, vorgezeichnet sind.

Abb. 6



Die vorgestanzten Löcher werden nun mit Hilfe einer Mikropipette, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist, ausgesaugt. Dabei ist zu beachten, dass sich die Agarschicht rund um das ovale Loch nicht abhebt (z.B. wenn die Saugpumpe zu stark eingestellt ist), da sich das Serum in diesem Spalt zwischen Objektträger und Agar-

schicht ausbreitet, später anfärbt und die Beurteilung des Präparates erschweren würde.

Während der vorher beschriebenen Arbeitsgänge lässt man die eingefrorenen Seren auftauen. Mit Hilfe von Mikropipetten werden ca. 0,001 ml Probandenserum eingefüllt. Die Mikropipetten werden hergestellt, indem man 20 cm lange Glasröhrchen mit 2 mm lichter Weite in der Mitte unter ständigem Drehen bis zum Glühen erhitzt und dann zu einem dünnen Faden auszieht. Verschiedene Lumina der Pipetten kann man durch entsprechende Verkürzung der Fäden erreichen.

Nachdem die Nummern der Objektträger und die Reihenfolge der Seren notiert sind, werden die Präparate auf einem Bänkchen in die Elektrophoresekammer gebracht.

Abbildung 7 zeigt eine zweckmässige Registrierung der Präparate.

Abb. 7

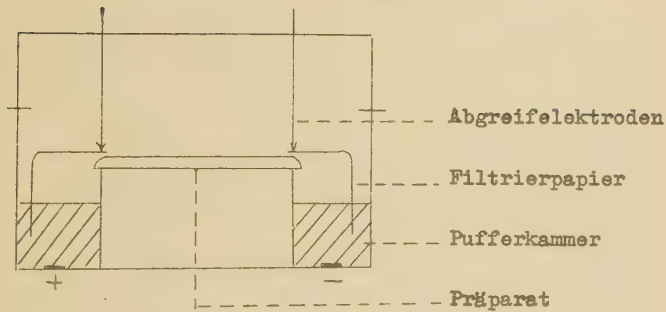
Nr. _____	Nr. Serum a	— Anti-Gc
_____	Serum b	

Die Elektrophoresekammer besteht aus zwei Pufferkammern, die mit Brückenpuffer gefüllt sind; zwischen diesen Pufferkammern befindet sich eine leere Kammer, über welche die Präparate zu liegen kommen. Am Boden der Pufferkammern befindet sich je ein Metallstreifen, an welchem beliebige Spannungen angelegt werden können. Der Stromkreis wird durch ein mit Brückenpuffer getränktes Filtrierpapier geschlossen, das auf jeder Seite von der Pufferkammer zu den Präparaten reicht, auf denen es ungefähr 1/2 cm aufliegt.

Da während der Elektrophorese eine Erwärmung der Agarplättchen auf etwa 25 - 28° C erfolgt (83), müssen die Objektträger abgedeckt werden, um ein Austrocknen zu verhindern.

Abbildung 8 zeigt ein Schema des Elektrophoresegerätes.

Abb. 8



An den Präparaten können Abgreifelektroden angebracht werden, mit denen die angelegte Spannung bzw. Stromstärke kontrolliert werden kann. Mit einem vorgeschalteten Gleichrichter mit Widerstand können Spannung und Stromstärke reguliert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für sechs Präparate bei 40 Volt, 25 mA innerhalb von 45 Minuten.

Nach der Elektrophorese wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe der Agar aus der vorgestanzten Mittelrinne gesaugt. In diese werden anschliessend ca. 0,04 - 0,06 ml Antiserum pipettiert (83). Je nach Fragestellung können z.B. bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung von menschlichen Seren multivalente Antiseren mit einer Vielzahl von Antikörpern gegen menschliche Serumproteine oder spezifische Antiseren, die gegen bestimmte Serumproteine (z.B. Albumin, γ_2 Globulin) gerichtet sind, angewandt werden. Je höher der Immunpräzipitationstiter der Antiseren ist, desto stärker sind die im Agar bei der Immunoelektrophorese erhaltenen Präzipitationslinien (S c h i c k 83). Bei den vorliegenden Versuchen wurde Anti-Co-Serum vom Pferd (Behringwerke) verwendet.

Nachdem die Präparate mit Antiserum beschickt sind, werden sie 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank zur Ausbildung der Präzipitate gehalten. Anschliessend werden die Objektträger 24 Stunden lang in physiologische Kochsalzlösung gelegt, damit nichtpräzipitierte Proteine herausgelöst werden, die angefärbt das Bild stören würden. Die Präzipitate können an und für sich schon jetzt diagnostiziert werden und zwar im Dunkelfeld mit Hilfe einer starken Lupe. Gewöhnlich werden aber die Präparate fixiert und angefärbt.

Dazu werden die Präparate nach der NaCl-Behandlung mit aqua dest. kurz abgespült, mit feuchtem Filtrierpapier abgedeckt und bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank getrocknet. Das aufgelegte Filtrierpapier verhindert ein Springen oder Verziehen des Agar. Wenn der Agar ganz getrocknet ist, wird das Filtrierpapier abgezogen und der Agar im fliessenden Wasser gereinigt.

Dann erfolgt die Fixierung der Präparate innerhalb von 5 Minuten in 2%iger Essigsäure. Anschliessend werden sie 24 Stunden lang in einer Amidoschwarzlösung gefärbt.

Die Entfärbung erfolgt unter mehrfachem Wechsel des Entfärbers innerhalb von ca. 10 Minuten. Wenn die Präparate getrocknet sind, können sie diagnostiziert bzw. photographisch festgehalten werden.

Krankengut

Bei Normalseren aus der Blutbank München und bei Patienten mit c.P. wurden die Gc-Gruppen-Bestimmungen durchgeführt. Die Patienten, die aus der Rheumaambulanz der Medizinischen Poliklinik München stammten, wurden nach Kriterien ausgewählt, die auf Seite 37 aufgeführt sind.

Ergebnisse

Tabelle 17 zeigt die Werte, die bei der Gc-Gruppen-Bestimmung bei Normalseren gefunden wurden.

Tabelle 17

Typ	Zahl	%
Gc 1-1	10	28,6
Gc 2-1	20	57,1
Gc 2-2	5	14,3
Gesamt:	35	100

Tabelle 18 bringt die Ergebnisse der Gc-Gruppen-Bestimmung bei c.P. - Patienten.

Tabelle 18

Typ	Zahl	%
Gc 1-1	15	35
Gc 2-1	16	37
Gc 2-2	12	28
Gesamt:	43	100

D i s k u s s i o n

Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen chronischer Polyarthrititis und den Gc-Typen einerseits und den Blutgruppen andererseits besteht. Dabei ergaben sich folgende Vergleichswerte für die Gc-Typenverteilung bei Normalseren. Tabelle 19 bringt die gefundenen Werte bei Normalseren der Blutbank München, Tabelle 20 zeigt die Gc-Typenverteilung bei bayerischen Blutspendern (B a i t s c h u n d J e n s s e n 3).

Tabelle 19

Typ	Zahl	%
Gc 1-1	10	28,6
Gc 2-1	20	57,1
Gc 2-2	5	14,3
Gesamt:	35	100

Tabelle 20

Typ	Zahl	%
Gc 1-1	119	57,1
Gc 2-1	68	32,8
Gc 2-2	21	10,1
Gesamt:	208	100

Bei Gc 2-2 sind die Prozentanteile in beiden Tabellen annähernd gleich. Bei den anderen beiden Gc-Typen zeigen sich jedoch verhältnismässig grosse Unterschiede. Es muss jedoch bei der Beurteilung des Unterschiedes der Prozentanteile berücksichtigt werden, dass die gefundenen Werte aus nur relativ wenigen Untersuchungen gewonnen wurden.

Die Gc-Typenverteilung bei chronischer Polyarthrititis ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21

Typ	Zahl	%
Gc 1-1	15	34,9
Gc 2-1	16	37,2
Gc 2-2	12	27,9
Gesamt:	43	100

Ein Vergleich der gefundenen Gc-Typenverteilung bei c.P. mit den obigen Werten aus der Gc-Typenverteilung nach Baitsch und Jenssen (3) sowie mit den von uns erhobenen Verteilungsquoten bei Normalseren ergibt nicht unerhebliche Abweichungen. Diese dürften in der geringen Zahl der von uns untersuchten Seren begründet sein und lassen keinen Schluss auf eine bei Patienten mit c.P. vorliegende andersgeartete Verteilung der Gc-Typen zu. Wenn man einen mit den Gc-Typen gekoppelten Erbfaktor für die chronische Polyarthrititis annehmen wollte, so müsste das praktisch ausschliessliche Vorhandensein eines Phänotyps bzw. eines Alleles beobachtet werden können. Um diese Aussage zu verneinen, genügt die von uns untersuchte Zahl von 43 Patienten mit chronischer Polyarthrititis. Damit kann als gesichert gelten, dass ein Zusammenhang zwischen chronischer Polyarthrititis und einem Gc-Typ nicht besteht.

Die vergleichsweise durchgeführten Untersuchungen der Blutgruppen bestätigen die bereits von anderer Seite (Rasch 75) erhobenen Befunde einer nicht bestehenden Abhängigkeit der chronischen Polyarthrititis von bestimmten Blutgruppen. Auch bei diesen Untersuchungen finden sich - wenn auch geringere - Abweichungen gegenüber den an einer grösseren Anzahl untersuchten Verteilungen nach Rasch (75). Tabelle 22 zeigt die Blutgruppenbestimmungen bei c.P.-Patienten, Tabelle 23 die Vergleichswerte nach Rasch.

Tabelle 22

Blut- gruppe	Zahl	%
A	5	29,4
AB	1	5,9
B	3	17,6
O	8	47,1
Gesamt:	17	100

Tabelle 23

Blut- gruppe	Zahl	%
A	104	42,8
AB	16	6,9
B	44	18,1
O	79	32,2
Gesamt:	243	100

Schliesslich wurden die gefundenen Gc-Typen und Blutgruppen einander gegenübergestellt; das Ergebnis bei Normalseren ist in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24

Typ	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	Gesamt:
A	4	8	3	15
AB	0	0	0	0
B	2	1	0	3
O	4	11	2	17
Gesamt:	10	20	5	35

Ähnliche Untersuchungen bei Normalseren wurden von R i r s c h - f e l d und B e o k m a n n (47) vorgenommen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 25.

Tabelle 25

Typ	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	Gesamt:
A	28	26	2	56
AB	4	2	1	7
B	7	5	0	12
O	30	14	3	47
Gesamt:	69	47	6	122

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen über Blutgruppen und Gc-Typen bei Patienten mit c.P. zusammengefasst.

Tabelle 26

Typ	Gc 1-1	Gc 2-1	Gc 2-2	Gesamt:
A	2	2	1	5
AB	0	1	0	1
B	3	0	0	3
O	1	4	3	8
Gesamt:	6	7	4	17

Die kleine Zahl der Untersuchungen erlaubt auch hier keinen schlüssigen Vergleich hinsichtlich der Verteilung der Gc-Typen in Bezug auf die Blutgruppen und umgekehrt. Es findet sich jedoch insofern Übereinstimmung, als weder bei Normalseren noch bei Seren von Patienten mit c.P. eine Abhängigkeit beider erblicher Systeme voneinander festgestellt werden kann.

Zusammenfassung

Es wurde bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis die Verteilung hinsichtlich der Blutgruppen und der Gc-Typen untersucht. Wenn auch die relativ kleine Zahl von 43 Patienten mit chronischer Polyarthrititis keinen sicheren Vergleich mit der in einem grösseren Krankengut festgestellten Typenhäufigkeit erlaubt, so kann doch beweisend festgestellt werden, dass die chronische Polyarthrititis nicht an bestimmte Gc-Typen oder an ein bestimmtes Gc-Allel gebunden ist.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Blutgruppen bestätigen die gleiche, bereits von anderen Autoren getroffene Feststellung. Auch fanden wir keine Abhängigkeit der Blutgruppen von den Gc-Typen. Damit wurde bisher noch keine Koppelung eines möglichen Erbfaktors für die chronische Polyarthrititis an erbliche Serumfaktoren gefunden. Das gilt insbesondere für das Auftreten des Rheumafaktors, da bei sämtlichen untersuchten Patienten der Rheumafaktor nachgewiesen werden konnte.

Literaturverzeichnis

- 1) Allison, A.C., Humphrey, J.H.: A theoretical and experimental analysis of double diffusion precipitin reactions in gels, and its application to characterisation of antigens. *Immunology* 3 (95-106) 1960.
- 2) Baitsch, H.: Bestimmungstechnik der Haptoglobintypen. *Ärztl. Labor* 8 (146-155) 1962.
- 3) Baitsch, H., Jenssen, W.: Zur Populationsgenetik des Gc-Systems: Allelenhäufigkeiten in einer Stichprobe bayerischer Blutspender. *Anthrop. Anz.* 25 (185-188) 1962.
- 4) Baitsch, H., Liebrich, K.G.: Die Haptoglobintypen. Methodik ihrer Bestimmung, Allelenhäufigkeiten in einigen Stichproben. *Ärztl. Labor.* (123) 1961.
- 5) Baitsch, H., Stumpf, W.: Immunelektrophoretischer Vergleich von Menschen- und Schimpansen Serum. *Anthrop. Anz.* 23 (72-74) 1959.
- 6) Ball, J., Lawrence, J.S.: Epidemiology of the sheep cell agglutination test. *Ann. rheum. Dis.* 20 (235) 1961.
- 7) Barnicot, N.A., Garlick, J.P., Roberts, D.F.: Haptoglobin and transferrin inheritance in northern nigerians. *Ann. hum. Gen.* 24 (171-183) 1959-60.
- 8) Bechhold, H.: Strukturbildung in Gallerten. *Z. phys. chem.* 52 (185-199) 1905.
- 9) Behrend, T., Cleve, H.: Immunoelktrophoretische Untersuchungen von Ultrazentrifugenpräparationen bei primär chronischer Polyarthrititis. *Z.f.Rheumaforschung* 19 (121) 1960.
- 10) Behrend, T.: Epidemiologische Untersuchungen über chronisch-entzündliche Rheumatismusfolgen in der Bevölkerung und in Arthritikerfamilien. *Z.f. Rheumaforschung* 22 (389) 1963.
- 11) Bergraham, B.: Glacial acetic and picric acids as a fixation for gel precipitation. *Nature (London)* 185 (242) 1960.
- 12) Bishop, J.O., Beale, G.H.: Genetical and biochemical studies of the immobilization antigens of *Paramecium aurelia*. *Nature* 186 (734) 1960.

- 13) Björklund, B.: Qualitative analysis of gel precipitates with the aid of chemical color reactions.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 85 (338-441) 1959.
- 14) Björklund, B., Katz, S.: The molekular weights and dimensions of some human serum lipoproteins. J. Amer. Soc. 78 (2122) 1956.
- 15) Bleücourt de, J.J.: Epidemiologische und Erblchkeitsuntersuchungen bei rheumatischen Erkrankungen, insbesondere rheumatoider Arthritis und Spondylitis ankylopoetica.
Z. f. Rheumaforschung II/I2 (413) 1963.
- 16) Bleücourt de, J.J., the late A. Polman, T. de Bleücourt-Meindersma: Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Ann. rheum. Dis. 20 (215) 1961.
- 17) Blumberg, B.S., Allison, A.C., Garry, B.: The haptoglobins and haemoglobins of Alaska eskimos and indians.
Ann. hum. Gen. 23 (349-356) 1958-59.
- 18) Butles, R.: Über gruppenspezifische Eigenschaften menschlicher Serumproteine. Schw. med. Wschr. 91 (1125) 1961.
- 19) Calmette, A., Massol, L.: Les precipitines du sefum antivenimeux vis-a-vis du venin de cobra.
Ann. Inst. Pasteur 23 (155-165) 1909.
- 20) Carlson, L.A.: Serum lipids in normal men. Acta med. Scand. 167 (377) 1960.
- 21) Cleve, H., Bearn, A.G.: Studies on the "group specific component" of human serum. Gene frequencies in several populations. Amer. J. hum. Genet. 13 (372-379) 1961.
- 22) Dahr, P.: Die Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung. V.: G. Thieme, Stuttgart (5-41) 1948.
- 23) Dittmer, A.: Papierelektrophorese. Grundlagen-Methodik-Klinik. V.: G. Fischer, Jena (50-96) 1961.
- 24) Edsall, J.T.: Structure of proteins. Nature 170 (53) 1952.
- 25) Edström, G.: Klinische Studien über den chronischen Gelenkrheumatismus. Acta med. Scand. 108 (398) 1941.
- 26) Eldon, K.: Gleichzeitige ABO- und Rh-Blutgruppenbestimmung auf Karten. Kopenhagen 1955. Aquila GmbH Pinneberg/Hamburg.
- 27) Galatius-Jensen, F.: Rare phenotypes in the Hp-system. Acta genet. stat. med. 8 (248-255) 1958.

- 28) Giblet, E.R., Hickmann, C.G., Smithies, O.: Serum transferrins.
Nature 183 (1589) 1959.
- 29) Glowatzki, G.: Die Haptoglobine. Med. Klinik 42 (1758) 1962.
- 30) Grabar, P.: The use of immunochemical methods in studies on proteins. Advances protein chem. XIII (1-30) 1958.
- 31) Grabar, P.: Die Entstehung der Antikörper.
Behringwerkmittelungen 35 (19-32) 1958.
- 32) Grabar, P., Williams, C.A.: Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim. biophys. Acta 10 (193) 1953.
- 33) Grubb, R.: A relationship between blood group serology and rheumatoid arthritis serology. Serum protein groups.
Vox sang. 2 (305) 1957.
- 34) Grubb, R.: Agglutination of erythrocytes coated with "incomplete" anti-rh by certain rheumatoid arthritis sera and some other sera. The existence of human serum groups.
Acta path. microbiol. Scand. 39 (195) 1959.
- 35) Grubb, R., Laurell, A.B.: Hereditary serological human serum groups. Acta path. microbiol. Scand. 39 (390-398) 1956.
- 36) Hangarter, W.: Das Erbbild der rheumatischen und chronischen Gelenkkrankheiten. V.: T. Steinkopff, Dresden, Leipzig (4) 1939.
- 37) Heide, K.: Gruppenspezifische Blutproteine.
Behringwerkmittelungen 38 (164-185) 1960.
- 38) Herrmann-Boussier, G., Moretti, J., Jayle, M.F.: Etude de l'haptoglobine. Propriétés physiques et chimiques des haptoglobines des types I et II et de leurs complexes avec l'hémoglobine.
Bull. Chim. Soc. biol. (Paris) 42 (837) 1960.
- 39) Hirschfeld, J.: Immunoelectrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. Acta path. microbiol. Scand. 47 (160) 1959.
- 40) Hirschfeld, J.: Individual precipitations patterns of normal rabbit sera. Acta path. microbiol. Scand. 46 (229) 1959.
- 41) Hirschfeld, J.: A simple method of determining haptoglobin groups in human sera by means of agar-gel electrophoresis.
Acta path. microbiol. Scand. 47 (169) 1959.

- 42) Hirschfeld, J.: Immuno-electrophoretic differentiation of haptoglobins from another group-specific system in normal human sera. *Nature* (London) 187 (126) 1960.
- 43) Hirschfeld, J.: Shape of the precipitate in immuno-electrophoresis. *Nature* 185 (164) 1960.
- 44) Hirschfeld, J.: Agar-gel electrophoretic demonstration of individual variations in electrophoretic position of an Indoxyl-acetate splitting component in the globulin region of normal human sera. *Nature* 186 (321) 1960.
- 45) Hirschfeld, J.: Variations in electrophoretic position of haptoglobin mixtures in agar-gel electrophoresis. *Nature* 186 (894) 1960.
- 46) Hirschfeld, J.: The Gc-system. *Progress Allergy* 6 (155) 1962.
- 47) Hirschfeld, J., Beckmann, L.: A new group specific serum system (Gc-groups) in relation to blood and serum groups. *Acta genet. stat. med.* 10 (48) 1960.
- 48) Hirschfeld, J., Jonsson, B., Rasmuson, M.: Inheritance of a new group-specific system demonstrated in normal human sera by means of immuno-electrophoretic technique. *Nature* 185 (931) 1960.
- 49) Jayle, M.F., Boussier, G.: Les seromucoides du sang. Leurs relations avec les mucoprotéines de la substance fondamentale du tissu conjonctif. *Ann. biochim. med.* 17 (157) 1955.
- 50) Jayle, M.F., Boussier, G., Badin, J.: Electrophorèse de l'haptoglobine et de son complexe hémoglobinique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1063) 1952.
- 51) Jenssen, W.: Untersuchungen zur Genetik der gruppenspezifischen Komponente. *Nat. Diss. München* 1962.
- 52) Jordal, K.: Blutgruppenbestimmung in einer Blutbank durch die Eldon-Methode. V.: Aquila Hamburg, Kopenhagen 1955.
- 53) Kellgren, J.H.: Heberden's Oration, 1963: The epidemiology of rheumatic diseases. *Ann. rheum. Dis.* 23 (109) 1964.
- 54) Klug, H., B.: Bluteiweißuntersuchungen bei Patienten mit primär chronischer Polyarthrit. Sonderdruck: *Die med. Welt* 49 (1) 1962.
- 55) Kluthe, R., Meyer, P.: Bestimmung des Haptoglobinspiegels bei Nierenerkrankungen. *Klin. Wschr.* 39 (205) 1961.

- 56) Köttgen, U.: Erb- und Umweltfaktoren beim Rheumatismus.
Ärztl. Praxis XIV/36 (1879) 1962.
- 57) Krammer, F.: Balneotherapie und Cortison bei Arthritis rheumatika. Ärztl. Praxis X/39 (1925) 1958.
- 58) Kramp, P.: Serologische Stammbaumforschung. Primatologia I
Basel-New York (1015) 1956.
- 59) Kraus, R.: Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus- und Pestbouillon-Kulturen, erzeugt durch homologes Serum.
Wien. klin. Wschr. 10 (736) 1897.
- 60) Lawrence, J.S., Ball, J.: Genetic studies on rheumatoid arthritis.
Ann. rheum. Dis. 17 (167) 1958.
- 61) Mathies, H., Schattenkirchner, M., Schleifer, E.: Heutiger Stand der Haptoglobinforschung. Med. Klin. 58 Nr.4 (121) 1963.
- 62) Miescher, F.: Neues Vorkommen der vererbaren Doppelalbuminämie. Schweiz. med. Wschr. 90 (1273) 1960.
- 63) Mollison, T.H.: Arteiweiss und Erbsubstanz.
Z. Morph. Anthropol. 34 (261) 1934.
- 64) Neff, J.C., Becker, E.L.: Antigen-antibody reactions in agar IV. Effect of antibody content another factors on the R' value.
Fed. Prod. 16 (427) 1957.
- 65) Northrop, J.H.: Purification and cristallization of diphtheria antitoxin. J. gen. ph ysiol. 25 (465-485) 1942.
- 66) Oudin, J.: L'analyse immunochemique qualitative, méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. Première partie.
Ann. Inst. Pasteur 75 (30-52) 1948.
- 67) Oudin, J.: L'analyse immunochemique qualitative, méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. Deuxième partie.
Ann. Inst. Pasteur 75 (109-130) 1948.
- 68) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.
Arkiv kemi mineral. geol. 26 B (1-9) 1948.
- 69) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gel. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion.
Acta path. microbiol. Scand. 32 (231-240) 1953.

- 70) Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. I. Progress. Allergy 5 (1-78) 1958.
- 71) Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Progress Allergy 6 (30-154) 1962.
- 72) Polonovski, M., Jayle, M.F.: Peroxydases animales. Bull. Soc. chim. biol. 20 (978) 1938.
- 73) Poulik, M.D.: Separation of prealbumin by starch gel electrophoresis. Nature 184 (1067) 1959.
- 74) Pribram, A.: Der akute Gelenkrheumatismus in Nothnagel: Pathologie und Therapie. V. Bd. II (367) Wien 1899.
- 75) Rasch, L.: Lehrbuch der Blutgruppenkunde. V.: Walter de Gruyter, Berlin (131-133) 1954.
- 76) Schade, H.: Fragen aus der Praxis. Dtsch. med. Wschr. 88 (1114) 1958.
- 77) Scheidegger, J.J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. Intern. Arch. Allergy 7 (103-110) 1955.
- 78) Scheiffarth, F., Berg, G., Götz, H.: Papierelektrophorese in Klinik und Praxis. V.: Urban-Schwarzenberg, München-Berlin. (25) 1962.
- 79) Schultze, H.E., Schwick, G.: Immunoelktrophoretischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine. Immunoelktrophoretische Studien. Behringwerkmittelungen 33 (11-37) 1957.
- 80) Schumacher, G., Schlumberger, H.D.: Eigenschaften, Bestimmung und klinische Bedeutung der H aptoglobine. Med. klin. Wschr. 40 (68) 1963.
- 81) Schumacher, G., Schlumberger, H.D.: Haptoglobinveränderungen bei posttraumatischen Entzündungen. Klin. Wschr. 40 (81) 1962.
- 82) Schwarzfischer, F., Ziegelmayr, G.: Untersuchungen an Familien und Mutter-Kind-Paaren zum forensischen Beweiswert des Systems Gc. Sonderdruck Med. Klinik 58 (3) 1963.
- 83) Schwick, G.: Die Technik der Immunoelktrophorese. Laboratoriumsblätter 8, 1958.

- 84) Seppä, U.: A study on the hereditary disposition to rheumatoid arthritis. *Acta rheum. Scand.* Vol. III (98) 1957.
- 85) Simon, K.H.: Haptoglobine und Hämoexine. *Med. Monatsschrift* 3 (147) 1963.
- 86) Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels: Group-variations in the serumproteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61 (629-641) 1955.
- 87) Smithies, O.: Grouped variations in the occurrence of new proteincomponents in normal human serum. *Nature* 175 (307) 1955.
- 88) Smithies, O., Hiller, O.: The genetic control of transferrins in humans. *Biochem. J.* 72 (121) 1959.
- 89) Smithies, O., Walker, N.F.: Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* 176 (1265) 1955.
- 90) Speiser, P.: Karl Landsteiner - Entdecker der Blutgruppen. V.: Br. Hollinek, Wien (67) 1961.
- 91) Sutton, H.E., Neel, J.V., Livingstone, F.B., Binson, G., Kunstater, P., Trombley, L.E.: The frequencies of haptoglobintypes in five populations. *Ann. hum. gen.* 23 (175-183) 1958-59.
- 92) Svedberg, T., Sjögren, B.: The molecular weights of Amandin and of Excelsin. *J. Amer. chem. soc.* 52 a (279-287) 1930.
- 93) Svedberg, T., Sjögren, B.: The p_H - stability regions of serum albumin and of serum globulin. *J. Amer. chem. soc.* 52 b (2855-2863) 1930.
- 94) Uhlenhuth, T.: Demonstration der Laktoserumreaktion. *Dtsch. med. Wschr.* 29 (39) 1903.
- 95) Weitz, W.: Die Vererbung innerer Krankheiten. V.: F. Enke, Stuttgart (145) 1936.
- 96) Wendt, G.G.: Serumelweiss und Vaterschaft. *Dtsch. med. Wschr.* 88 (19) 1963.
- 97) Wieme, R.J.: Über einige Aspekte der Elektrophorese im Agar-Gel. *Behringwerkmittelungen* 34 (27-37) 1957.
- 98) Wiener, A.S., Wexler, I.B.: Die Vererbung der Blutgruppen. V.: G. Thieme, Stuttgart (1-47) 1960.

- 99) Williams, C.A., Grabar, P.: Immunelectrophoretic studies on serum proteins. J. immunol. 74 (158) 1955.
- 100) Wuhrmann, F.: Albumindoppelzacken als vererbare Bluteiweiss-anomalie. Schweiz. med. Wschr. 89 (150) 1959.
- 101) Wuhrmann, F., Märki, H.H.: Dysproteinämien und Paraproteinämien. V.: Schwabe, Basel/Stuttgart (232-251) 1963.
- 102) Wunderly, Ch.: Immunelektrophorese. Behringwerkmittelungen 34 (81-90) 1957.
- 103) Ziff, M.: The agglutination reaction in rheumatoid arthritis. J. chron. Dis. 5 (644) 1957.
- 104) Ziff, M.: Genetics, hypersensitivity and the connective tissue diseases. Amer. J. Med. 30 (1) 1961.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Mathies danke ich für die Überlassung des Themas und Herrn Doz. Dr. I. Imre für die Einarbeitung in die experimentellen Untersuchungen und die Anleitung bei der Abfassung des theoretischen Teiles der Arbeit. Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des experimentellen Teiles meiner Arbeit an der Medizinischen Poliklinik München ermöglichte.

Lebenslauf

Am 2. März 1940 wurde ich, Irmgard Hindelang in Ebersberg bei München, als Tochter des Dipl. Volkswirts Rudolf Hindelang und seiner Ehefrau Maria geboren.

Von 1946 - 1950 besuchte ich die Volksschule in Ebersberg, von 1950 - 1956 die Oberrealschule in Grafing bei München und ab 1956 das Realgymnasium der Armen Schulschwestern am Anger in München, wo ich mich 1959 der Reifeprüfung unterzog.

Im Winter 1959/60 begann ich in München mit dem Medizinstudium und legte dort im April 1962 das Physikum ab und vollendete am 28. Juli 1965 ebenfalls in München das Staatsexamen.

Am 1. 11. 1965 begann ich mit der Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit.

